



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

235514

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³

C 07 D 473/30

(22) Přihlášeno 13 03 81

(21) (PV 1846-81)

(32) (31)(33) Právo přednosti od 14 03 80
(130334) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 31 08 84

(45) Vydáno 15 11 86

(72) Autor vynálezu

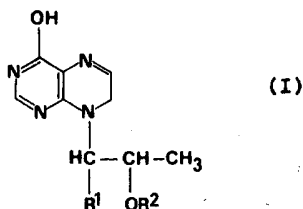
SIMON LIONEL NORTON, SANTA ANA, CALIFORNIA, GINER-SOROLLA ALFREDO,
RIVERSIDE, CONNECTICUT, GUTTAG ALVIN, BETHESDA, MARYLAND (Sp. st. a.)

(73) Majitel patentu

NEWPORT PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL, Inc., NEWPORT BEACH, CALIFORNIA,
SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK,
NEW YORK, (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby esterů hydroxyalkylpurinů

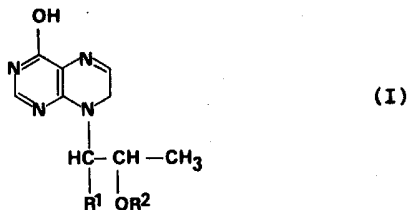
Předmětem vynálezu je způsob výroby
esterů hydroxyalkylpurinů obecného vzorce I



který spočívá v tom, že se nechá reagovat
hydroxyalkylpurin obecného vzorce II
s kyselinou odpovídající alkanoylovému
zbytku nebo s jejím anhydridem, za vzniku
sloučeniny obecného vzorce I.

Sloučeniny vyrobitelné podle vynálezu
působí jako imunomodulátory, mají protivi-
rový účinek a účinek proti nádorům a jsou
také inhibitory enzymů. Sloučeniny se
mohou používat též k zavádění odpovídajícího
alkoholu do biologických systémů.

Tento vynález se týká způsobu výroby esterů hydroxyalkylpurinů obecného vzorce I



kde

R^1 znamená alkylovou skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku a

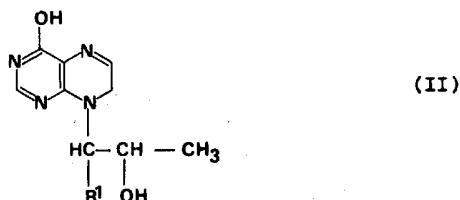
R^2 znamená alkanoylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, která je popřípadě v poloze Ω substituována karboxylovou skupinou nebo alkanoylovou skupinou se 2 až 5 atomy uhlíku, která je substituována v poloze α aminoskupinou.

Sloučeniny podle vynálezu jsou imunomodulátory, mají účinek proti virům a proti nádorům, zvláště antileukemický účinek a jsou také inhibitory enzymů. Tyto sloučeniny se mohou používat také k zavedení odpovídajícího alkoholu do biologických systémů, v některých případech se zvýšeným účinkem.

Kyselinová část představovaná alkanoylovou skupinou R^2 může být například odvozena od nesubstituovaných alifatických monokarboxylových kyselin s 1 až 5 atomy uhlíku, jako od kyseliny mravenčí, octové, propionové, máslé, valerové, isovalerové, nebo od nesubstituovaných alifatických dikarboxylových kyselin, například od kyseliny malonové, fumarové, maleinové, jantarové, glutarové a rovněž kyseliny uhličitě. S dikarboxylovými kyselinami se obvykle tvoří poloestery, jako je například hemimalonát, hemifumarát, hemimaleát a hemisukcinát, stejně jako methylkarbonát a ethylkarbonát.

Skupina R^2 může být také odvozena od aminokarboxylové kyseliny nebo aromatické karboxylové kyseliny.

Způsob výroby esterů hydroxyalkylpurinů obecného vzorce I je založen na o sobě známém způsobu a spočívá v tom, že se nechá reagovat hydroxyalkylpurin obecného vzorce II



kde

R^1 má výše uvedený význam,

s kyselinou odpovídající alkanoylovému zbytku nebo s jejím anhydridem, za vzniku sloučeniny obecného vzorce I.

Při výhodném způsobu se jako výchozí látky použije hydroxyalkylpurinu obecného vzorce II, ve kterém R^1 znamená hexylovou skupinu s přímým řetězcem.

Způsob podle vynálezu se účelně provádí tak, že se hydroxyalkylpurin nechá reagovat N-karbobenzoxglycinem nebo N-karbobenzoxalaninem v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu a potom se N-karbobenzoxyskupina odstraní hydrolyzou.

Je potvrzenou skutečností, že mnozí zprostředkovatelé infekcí, jako jsou viry (virus chřipky, HSV, Friend leukemia virus), bakterie a plísňe, způsobují potlačení imunního stavu hostitele, oslabující jeho obranu proti nákazám způsobeným zprostředkovateli infekcí. Mnohé druhé protivirové antimetabolické látky, jako AraC, potlačují obranný imunní mechanismus hostitele a tím mocně působí na oslabení jeho tělesného přirozeného obranného mechanismu a zvyšují druhotnou nákazu.

Imunopotenciátor neboli imunomodulátor je přípravek, který buď obnovuje zeslabenou imunní funkci nebo zvyšuje normální imunní funkci nebo má obě tyto funkce. Imunní funkce je definována jako vývoj s vyjádření humorální (protilátkou zprostředkované) imunity, buněčné (thymocytem zprostředkované) imunity nebo makrofagy a granulocyty zprostředkované odolnosti. Tak logicky zahrnuje přípravky působící přímo na buňky zahrnuté ve vyjádření imunní odezvy nebo buněčné a molekulární mechanismy, které naopak způsobují změnu funkce buněk zahrnutých do imunní odezvy. Zvětšení imunní funkce může být výsledkem účinku přípravku k odstranění potlačujícího mechanismu odvozeného od účinků negativní zpětné vazby endogenní nebo exogenní k imunnímu systému. Imunní potenciátory mají různé mechanismy účinku. Vzdor rozdílnosti umístění buňky při účinku a biochemickému mechanismu účinku imunopotenciátorů, jejich použití jsou v podstatě stejné, to jest ke zvýšené odolnosti hostitele.

Použití imunopotenciátorů

1) Základní ochranná funkce imunního systému se vztahuje k odolnosti proti napadení patogenními organismy, mezi které se zahrnují viry, rickettsie, mykoplasmy, bakterie, houby a paraziti všech typů. Tek zlepšení imunní odezvy zvláště když je snižena, by pochopitelně zlepšilo odolnost proti náaze nebo zamoření kterýmkoliv ze shora uvedených patogenních organismů. Samotný imunopotenciátor nebo v kombinaci s protiinfekční terapií se může používat při některé nebo všech infekčních chorobách.

2) Za druhou ochrannou funkci imunního systému se pokládá odolnost k transplantaci tkání cizího původu, buď přírodního, jako plodového mateřského původu nebo umělého, jako provedeného transplantování lékařem. Imunopotenciátory se mohou také použít k tomu, aby se usnadnilo vyjití plodových tkání nebo tkáně mateřského lůžka, nebo aby se modifikovala, nebo vzbudila tolerance k transplantované tkáni.

3) Za třetí ochrannou funkci imunního systému se považuje odolnost k zhoubným buňkám vyvinutým jako rakovina. Imunopotenciátory se mohou použít k ošetřování rakoviny tím, že se zvyšuje odmítání zhoubného nádoru a potlačuje se možnost opakování nádoru po jiných formách terapie.

4) Čtvrtá ochranná funkce zahrnuje schopnost rozpoznat cizí a udržovat vlastní nereaktivnost pozitivními potlačovacími mechanismy. Při autoimunních a příbuzných chorobách je imunní reaktivita zaměřena na vlastní antigeny, nebo nadměrné zvýšené odezvy jsou zřejmé jako samodestruktivní. Imunopotenciátory se mohou používat k obnovení normálních tlumících mechanismů, působících snášenlivost, nebo jinak mohou podporovat normální imunní odezvu.

Každá z ochranných funkcí imunního systému se může změnit nespecifickou terapií se samotnými imunopotenciátory nebo v kombinaci s jinými prostředky používanými ke zlepšení odolnosti nebo k usmrcení patogenů způsobujících napadení.

Kromě toho specifická odolnost se může zvýšit za použití imunopotenciátorů ve spojení s některými formami antigenu, jako při použití vakcíny, například viru, nádorových buněk a podobně. Toto použití může vést buď k specifické imunitě nebo snášenlivosti. Snášenlivost se může dosáhnout například za použití antigenu při alergii nebo autoimunním onemocnění. Použití imunopotenciátorů může být buď terapeutické nebo profylaktické, přičemž profylaktické použití je vhodné zvláště ve stadiu, když infekce, autoimunita a rakovina jsou obecnější.

Stanovení doby a cesty podání se může měnit a může být rozhodující při stanovení výsledků, zda se dosahuje kladné nebo záporné odezvy. Každý přípravek, který je schopný zvětšit imunní odezvu, může jí potlačit v závislosti na době podání a dávce a tak, za určitých podmínek, by mohl být imunopotenciátor použit jako přípravek ke snížení imunity, pro použití při alergii, autoimunitě a transplantaci.

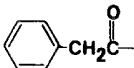
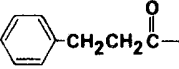
Základní alkohol, kde R^1 značí hexyl, je erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)hypoxanthin a ten byl testován pod identifikačním číslem NPT 15392. Mezi sloučeniny podle tohoto vynálezu patří erythro-9-(2-acetoxy-3-nonyl)hypoxanthin (identifikován jako NPT 15458, viz příklad 1), erythro-9-(2-sukcinoxy-3-nonyl)hypoxanthin (identifikován jako NPT 15457, viz příklad 2) a erythro-9-(2-fosfát-3-nonyl)hypoxanthin.

Další sloučeniny podle vynálezu zahrnují například takové, které jsou uvedeny v tabulce 1. V této tabulce alkylová skupina R^1 znamená vždy n-alkyl.

T a b u l k a 1

R^1	R^2
C_6H_{13}	$CH_3CH_2C(=O)-$
C_6H_{13}	$CH_3CH_2CH_2C(=O)-$
C_6H_{13}	$CH_3(CH_2)_{14}C(=O)-$
C_6H_{13}	$CH_3(CH_2)_{16}C(=O)-$
C_6H_{13}	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7C(=O)-$ (cis)
C_6H_{13}	$HOOCCH_2C(=O)-$
C_6H_{13}	$HOOCCH=CHC(=O)-$ (cis)
C_6H_{13}	$HOOCCH=CHC(=O)-$ (trans)
C_6H_{13}	$HOOCCH_2CH_2C(=O)-$
C_6H_{13}	$HOOC(CH_2)_3C(=O)-$
C_6H_{13}	$CH_2(NH_2)C(=O)-$
C_6H_{13}	$CH_3CH(NH_2)C(=O)-$
C_6H_{13}	$H_2NC(=NH)NHCH_2CH_2CH_2CH(NH_2)C(=O)-$
C_6H_{13}	$H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)C(=O)-$
C_6H_{13}	$CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)C(=O)-$
C_6H_{13}	$(CH_3)_2CHCH_2CH(NH_2)C(=O)-$

Tabulka 1 - pokračování

R ¹	R ²
C ₆ H ₁₃	
C ₆ H ₁₃	
C ₆ H ₁₃	O-HOC ₆ H ₅ -C(=O)-
C ₆ H ₁₃	-PO ₃ H ₂
C ₆ H ₁₃	-NO ₂
C ₆ H ₁₃	CH ₃ CH < (acetal acetaldehydu)
C ₆ H ₁₃	glukosid
C ₆ H ₁₃	ribosid
C ₆ H ₁₃	fruktosid
C ₆ H ₁₃	mannosid
C ₆ H ₁₃	rhamnosid
C ₆ H ₁₃	xylosid
C ₆ H ₁₃	galaktosid
C ₆ H ₁₃	arabinosid
CH ₃	
CH ₃	HOOCCH ₂ CH ₂ -C(=O)-
CH ₃	glukosid
CH ₃	-PO ₃ H ₂
C ₂ H ₅	
C ₂ H ₅	HOOCCH ₂ CH ₂ -C(=O)-
C ₂ H ₅	glukosid
C ₃ H ₇	
C ₃ H ₇	HOOCCH ₂ CH ₂ -C(=O)-

T a b u l k a 1 - pokračování

R ¹	R ²
C ₄ H ₉	$\text{CH}_3\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$
C ₅ H ₁₁	$\text{CH}_3\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$
C ₅ H ₁₁	$\text{HOOCCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{C}-$
C ₅ H ₁₁	glukosid
C ₅ H ₁₁	$-\text{PO}_3\text{H}_2$
C ₇ H ₁₅	$\text{CH}_3\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$
C ₇ H ₁₅	$\text{HOOCCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{C}-$
C ₇ H ₁₅	glukosid
C ₈ H ₁₇	$\text{CH}_3\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$
C ₈ H ₁₇	$\text{HOOCCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{C}-$
C ₈ H ₁₇	glukosid
C ₈ H ₁₇	$-\text{PO}_3\text{H}_2$

Pro NPT 15392 bylo již dříve doloženo, že má protivirový imunomodulační účinek a účinek proti nádorům.

Výsledky zde předkládané dokládají, že

- 1) se mohou vyrobit nové deriváty NPT 15392, které se
- 2) mohou převádět v biologických systémech na účinnou látku (NPT 15392),
- 3) vedou k vyšší úrovni účinných látek (NPT 15392) v krvi a proto se zvyšuje účinek NPT 15392.

Následující tabulka shrnuje chemické vlastnosti některých sloučenin podle vynálezu.

T a b u l k a

Chemické vlastnosti reprezentativních příkladů sloučenin uvedených v předmětu vynálezu

	Teplota tání	Analýza	
		Vypočteno	Nalezeno
Erythro-9-(2-acetoxy-3-nonyl)-hypoxanthin (NPT 15458) ^x	15C-151 °C	C 59,97	59,83
		H 7,55	7,42
		N 17,48	17,39
Erythro-9-(2-sukcinoxy-3-nonyl)-hypoxanthin (NPT 15457) ^{xx}	-	-	-

$\lambda_{\max}/\lambda_{\max} 10^3$			$\lambda_{\min}$	
pH 1,0	pH 7	pH 9,5	pH 1	pH 7
250/9,7	249,5/10,1	254/10,06	220	222,5
250/-	249/-	254/-	222	223

^x Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) - jediný UV pík na sloupci 5 μ m Spherosorbu ODS 2,1 x 250 mm, za použití 65% methanolu jako rozpouštědla: 35% 0,05 M H_3PO_4 .

^{xx} Jediný UV pík na sloupci 5 μ m Ultraspheru ODS 4,6 x 250 mm za použití 65% methanolu jako rozpouštědla: 35% 0,05 M H_3PO_4 .

Imunopotenciátory podle vynálezu se mohou používat například k dosažení odolnosti při napadení viry uvedenými v tabulce A.

T a b u l k a A

Virus	Třída	Nemoc
Arenavirus	RNA	Rift Valley
Chřipky	RNA	Chřipka
Rhinovirus	RNA	Obecné nachlazení
Polio	RNA	Polio
Spalniček	RNA	Spalničky
Virus Newcastlské choroby	RNA	Newcastlská drůbeží choroba
Rotavirus	RNA	Gastroenteritida u dětí
Hepatitis typ A	RNA	Infekční hepatitida
Vztekliny	RNA	Vzteklina
Arbovirus	RNA	Encefalitida
Vaccinia	DNA	Neštovice
Herpes Simplex	DNA	Encefalitida, syfilis
Herpes Zoster	DNA	Pásový opar
Varicella Zoster	DNA	Plané neštovice
Adenovirus	DNA	Zánět cest dýchacích
Hepatitis typ B	DNA	Chronická hepatitida, Seyrehepatitida
Virus způsobující slin-tavku a kulhavku	DNA	Slintavka a kulhavka
Machupo	DNA	Chrlení krve

Sloučeniny jsou zvláště vhodné proti RNA virům.

Sloučeniny a prostředky podle vynálezu jsou vhodné k ošetřování savců (buněk savců), včetně člověka, vepřů, psů, koček, skotu, koňů, ovcí, koz, myší, králíků, krys, morčat, křečků, opic a podobně.

Pokud není uvedeno jinak, všechny díly a procenta jsou míněny hmotnostně.

Pokud není uvedeno jinak, všechny teploty jsou ve stupních Celsia.

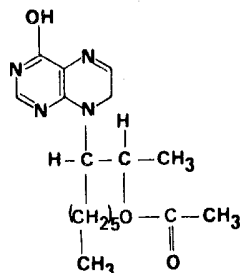
Prostředky mohou zahrnovat, v podstatě sestávat z uvedených materiálů, Způsoby mohou zahrnovat, v podstatě sestávat ze stupňů, které se provádějí s uvedenými materiály.

Prostředky se mohou podávat savcům obvyklou technikou, například orálně, nasálně, rektálně, vaginálně nebo parenterálně. Mohou se používat jako roztoky pro injekce, například ve vodě, nebo jako tablety, pilulky, kapsle a podobně.

Dále se uvádí popis výhodného provedení.

P ř í k l a d 1

Syntéza erythro-9-(2-acetoxy-3-nonyl)-hypoxanthinu (NPT 15458) (acetylnonylhypoxanthinu) vzorce



2,78 g (10 mmol) erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)hypoxanthinu, NPT 15392 se rozpustí ve 120 ml pyridinu a přidají se 3 ml (30 mmol) anhydridu kyseliny octové. Roztok se udržuje za teploty 25 °C 24 hodiny. Potom se přidá 50 ml ethanolu a roztok se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Tento postup se opakuje čtyřikrát, aby se odstranil pyridin. K odparku se přidá 150 ml etheru a výsledná pevná látka se získá filtrací. Sraženina se třikrát promyje etherem. Získá se tak bílý krystalický materiál o hmotnosti 2,51 g (80 %), který má teplotu tání 150 až 151 °C. UV_{max} (H₂O, pH 5,5) 249 nm. A_m 10,1 x 10³, IČ 1 700 cm⁻¹ (C=O).

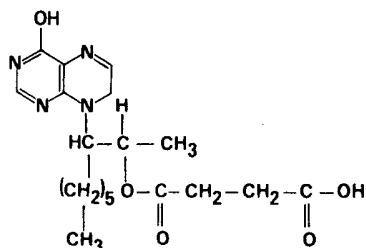
Analýza pro C₁₆H₂₄N₄O₃:

vypočteno: C 59,97 %, H 7,55 %, N 17,48 %,
nalezeno: C 59,83 %, H 7,42 %, N 17,39 %.

Vzestupná chromatografie (papír Whatman #1), hodnota R_F : n-butenol/H₂O/AcOH (2 : 1 : 1) = 0,92; ethanol/ 1 M octan amonný (14 : 6) = 0,88; isopropylalkohol/konc. amoniak/H₂O (7 : 2 : 4) = 0,90.

P ř í k l a d 2

Syntéza erythro-9-(2-sukcinoxy-3-nonyl)hypoxanthinu (sukcinylnonylhypoxanthinu) (NPT 15457) vzorce



600 mg (2,2 mol) erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)hypoxanthinu (NPT 15392) a 1 g (10 mmol) anhydridu kyseliny jantarové se rozpustí za míchání v minimálním objemu pyridinu. Roztok se opatrně zahřívá (přibližně na 30 °C) za nepřetržitého míchání po dobu 10 dnů.

Na rotační odparce se odstraní pyridin a odparek se extrahuje 20 ml absolutního ethanolu po dobu 48 hodin. Tento roztok se odstředí a horní vrstva se čistí preparativní chromatografií na tenké vrstvě (2 mm silikagelu 60, n-butanol : 2 N hydroxid amonný = 10 : 2, objemově). Pás při $R_f = 0,17$ se eluuje v absolutním ethanolu. Čistota produktu se zjistí chromatografií na tenké vrstvě (TLC) a UV spektrofotometrií.

Chemická stabilita

Údaje uvedené v tabulce 3 jasně dokládají, že estery NPT 15458 a NPT 15457 jsou stabilní, pokud se inkubují za teploty 37 °C a neutrálního pH (7,0, fyziologická hodnota). Skutečnost, že hydrolýzou bazických podmínek je možné provést jak acetyl- (NPT 15458), tak sukcinylester (NPT 15457) na NPT 15392 je dalším potvrzením jejich struktury.

T a b u l k a 3

Účinek změny pH na chemickou stabilitu acetoxynonylhypoxanthinu (NPT 15458) a sukcinonylhypoxanthinu (NPT 15457)

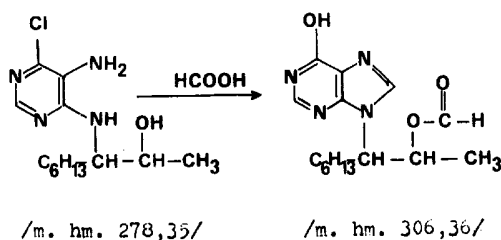
Sloučenina (koncentrace)	pH	% NPT 15392 ^x
NPT 15392 (0,36 μ /ml) (kontrolní stanovení)	1,0	100
	7,0	100
	9,5	100
NPT 15457 (0,36 μ /ml)	1,0	2
	7,0	0
	9,5	8
NPT 15458 (0,36 μ /ml)	1,0	8
	7,0	0
	9,5	28

^x 3,5 hodinová inkubace za teploty 37 °C, stanoveno za použití vysokotlaké kapalinové chromatografie.

P ř í k l a d 3

Syntéza 9-(2-formiát-3-nonyl)hypoxanthinu (MV IV-233)

Postup výroby vyjadřuje vztah



30 g (0,104 mol) erythro-5-amino-4-chlor-6-(2-hydroxy-3-nonylamino)pyrimidinu se rozpustí ve 300 ml 98 % kyseliny mravenčí a zahřívá pod zpětným chladičem 34 hodiny. Reakční směs se po ochlazení vylije na 500 ml ledové vody, sraženina se shromáždí a promyje studenou vodou. Výtěžek činí 28,8 g (74,8 %), teplota tání: 218 až 219 °C, po dvojnásobné rekrystalizaci ze směsi ethylalkoholu a vody teplota tání vzroste na 219 až 220 °C.

UV : $\lambda_{\text{max.}} = 249,5$ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$),

IČ (KBr) : 3 100, 2 950, 2 850, 1 720, 1 210, 1 170.

NMR (d^6 - DMSO) : 12,23 (široký (1H), zmizí s D_2O), 8,25 s (1H), 8,22 s (1H), 8,07 s (M), 5,39 - 5,21 sl. (1H), 4,79 - 4,58 sl. (1H). 2,52 - 1,98 sl. (2H), 1,14 - 1,07 sl. (11 H) 0,79 t (3H).

M.S.M⁺ = 306

Analýza pro $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$:

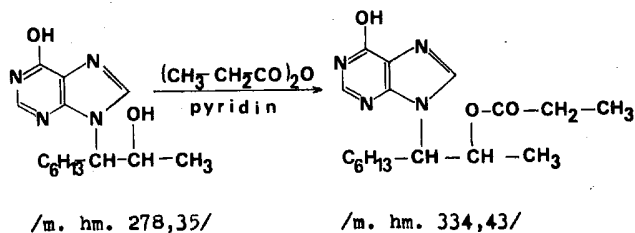
vypočteno: 58,80 % C, 7,23 % H, 18,28 % N,

nalezeno: 58,82 C, 7,22 % H, 18,24 % N.

P ř í k l a d 4

Syntéza 9-(2-propionát-3-nonyl)hypoxanthinu (AGM I-151) SK 31,141

Postup výroby vyjadřuje vztah



1 g (3,6 mmol) erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)hypoxanthinu, 5 ml (30 mmol) anhydridu kyseliny propionové a 10 ml pyridinu se míchá za teploty 25 °C po dobu 48 hodin. Po ochlazení na ledové lázni se přidá 5 ml methylalkoholu a směs se odpaří za sníženého tlaku. Opět se přidá dvakrát 20 ml methylalkoholu a provede odpaření. Olejovitý odparek ztuhne přidáním 30 ml ethyletheru. Produkt se odfiltruje a dvakrát promyje 20 ml ethyletheru, 20 ml vody, suší ve vakuu a rekrystaluje z ethylacetátu. Výtěžek činí 0,35 g (29 %). Teplota tání 122 až 124 °C se po dalších dvou rekrystalizacích nezmění.

IC (KBr) : 3 450, 3 100, 3 000, 1 740, 1 710, 1 210.

NMR (d^6 - DMSO) : 12,32 (široký, (1H), zmizí s D_2O), 8,23 s (1H), 8,05 s (1H), 5,25 - 5,13 sl. (1H), 4,67 - 4,56 sl. (1H), 2,26 δ (2H), 1,92 sl. (2H), 1,16 - 0,99 sl. (19M), 0,79 t (3H).

Analýza pro $C_{17}H_{26}N_4O_3$:

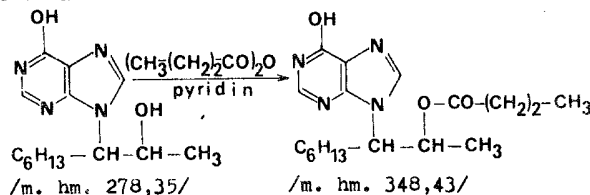
Vypočteno: 61,05 % C, 7,84 % H, 16,75 % N,

nalezeno: 60,94 % C, 7,82 % H, 16,22 % N.

P ř í k l a d 5

Syntéza 9-(2-butyrát-3-nonyl)hypoxanthinu (MV IV-292)

Postup výroby vyjadřuje vztah



1 g (3,6 mmol) erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)hypoxanthinu, 5 ml (30 mmol) anhydridu kyseliny n-máslé a 10 ml pyridinu se míchá za teploty 25 °C po dobu 48 hodin. Po ochlazení na ledové lázni se přidá 5 ml methylalkoholu a směs se odpaří za sníženého tlaku. Opět se přidá dvakrát 20 ml methylalkoholu a provede odpaření. Olejovitý odparek ztuhne přidáním 50 ml ethyletheru a ochlazením. Produkt se odfiltruje a dvakrát promyje 20 ml ethyletheru, 20 ml vody, suší ve vakuu a rekrystaluje ze směsi methylalkoholu a vody. Výtěžek činí 0,95 g (76 %), teplota tání: 168 až 169 °C.

Vzorek pro analýzu se připraví trojnásobnou rekrystalizací ze směsi methylalkoholu a vody. Teplota tání činí 170 až 171 °C.

UV : λ_{max} = 248 (C_2H_5OH),

NMR (d^6 - DMSO) : 12,32 (široký (1H), zmizí s D_2O), 8,23 s (1H), 8,05 s (1H), 5,27 - 5,15 sl. (1H), 4,67 - 4,56 (1H), 2,25 t (3H), 2,18 sl. (2H), 1,51 δ (2H), 1,4 - 0,78 sl. (17H).

Analýza pro $C_{18}H_{28}N_4O_3$:

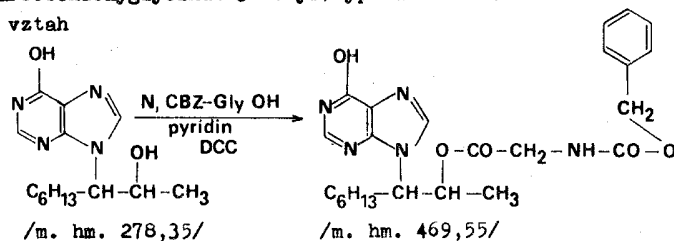
vypočteno: 62,04 % C, 8,10 % H, 16,08 % N,

nalezeno: 61,91 % C, 8,03 % H, 16,18 % N.

P ř í k l a d 6

Syntéza 9-(2-N-karbobenzoxylglycinát-3-nonyl)hypoxanthinu (AGM I-161)

Postup vyjadřuje vztah



0,7 g (2,5 mmol) erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)hypoxanthinu, 0,53 g (2,5 mmol) N-karbobenzoxylglycinu a 0,55 g (2,6 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) se rozpustí v 10 ml pyridinu. Po přidání jedné kapky kyseliny ethansulfonové se směs míchá přes noc za teploty 25 °C.

Po odpaření za sníženého tlaku se přidá 30 ml ethylacetátu a výsledná sraženina dicyklohexylmočoviny se odfiltruje. Filtrát se promyje 50 ml 5% kyseliny chlorovodíkové a 50 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Roztok se suší síranem hořečnatým, odpaří se za sníženého tlaku. Odparek se rekrystaluje z ethylacetátu a ethyletheru. Získá se 0,5 g produktu (42,7 %), teplota tání: 135 až 140 °C.

Vzorek pro analýzu se připraví trojnásobnou rekrystalizací ze směsi ethylacetátu a ethyletheru, jeho teplota tání činí 137 až 140 °C.

IČ (KBr)

NMR (d^6 - DMSO) : 12,02 (široký (1H), zmizí s D_2O), 8,24 s (1H), 8,06 d (1H), 7,73 t (1H), 7,36 s (5H), 5,28 - 5,16 (1H), 5,06 s (2H), 4,62 sl. (1H), 3,75 d (2H), 1,99 sl. (2H), 1,15 - 1,04 sl. (11H), 0,79 t (3H).

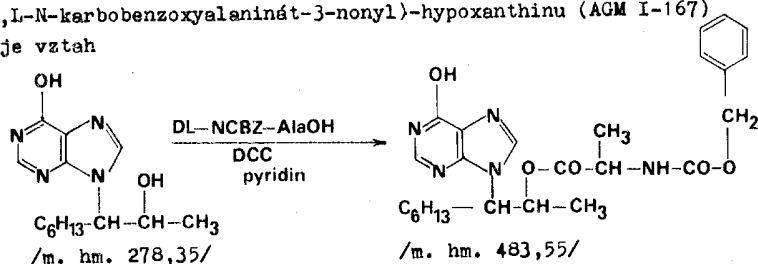
Analýza pro $C_{24}H_{31}N_5O_5$:

vypočteno: 61,39 % C, 6,65 % H, 14,92 % N,
nalezeno: 61,30 % C, 6,49 % H, 14,91 % N.

Příklad 7

Syntéza 9-(2-D,L-N-karbobenzoxyalaninát-3-nonyl)-hypoxanthinu (AGM I-167)

Postup vyjadřuje vztah



2,1 g (7,5 mmol) erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-hypoxanthinu, 1,7 g (7,6 mmol) D,L-N-karbobenzoxyalaninu a 1,65 g (8 mmol) dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) se rozpustí ve 30 ml pyridinu a přidá 1 kapka kyseliny ethansulfonové. Směs se míchá přes noc za teploty 25 °C, odpaří za sníženého tlaku, přidá 100 ml ethylacetátu a výsledná dicyklohexylmočovina se odfiltruje. Filtrát se promyje 100 ml 5% kyseliny chlorovodíkové a 100 ml 5% roztoku uhličitanu sodného, potom suší síranem hořečnatým a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rekrystaluje z ethylacetátu a methanolu. Získá se 1,65 g produktu (45,5 %), teplota tání: 177 až 180 °C.

Vzorek pro analýzu se připraví trojnásobnou rekrystalizací ze směsi ethylacetátu a methanolu, jeho teplota tání činí 185 až 187 °C.

IČ (KBr)

NMR (d^6 - DMSO) : 12,33 (široký (1H), zmizí s D_2O), 8,22 s (1H), 8,05 s (1H), 7,8 d (1H), 7,36 s (5H), 5,22 - 5,13 sl. (1H), 5,06 s (2H), 4,58 sl. (1H), 4,19 - 4,11 sl. (1H), 2,0 sl. (2H), 1,28 - 0,99 (14H), 0,78 t (3H).

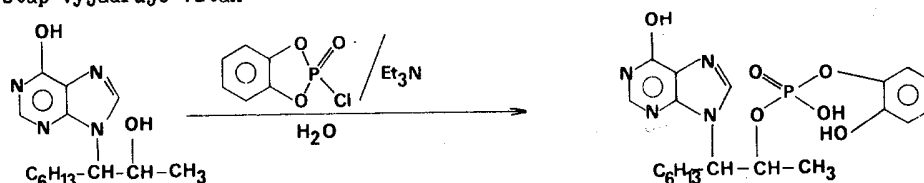
Analýza pro $C_{25}H_{33}N_5O_5$:

vypočteno: 62,09 % C, 6,88 % H, 14,48 % N,
nalezeno: 62,00 % C, 6,75 % H, 14,44 % N.

Příklad 8

Syntéza 9-(2-O-fenylendiohydrogenfosfát-3-nonyl)-hypoxanthinu (AGM I-191)

Postup vyjadřuje vztah



(Porovnej T. A. Khwaja a C. B. Reese, Tetrahedron **27**, 6189 (1971) a T. A. Khwaja, C. B. Reese a J. C. M. Stewart, J. Chem. Soc. (C), 2092 (1970)).

Roztok 0,662 g (3,3 mmol) o-fenylendiofosforochloridu v 8 ml acetonitrilu se přidá za míchání k suspenzi 0,834 g (3 mmol) erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-hypoxanthinu a 0,101 g (3 mmol) triethylaminu v 8 ml acetonitrilu. Směs se míchá za teploty 25 °C přes noc, přičemž po 15 až 30 minutách se přemění v homogenní roztok. Poté se přidají 3 ml vody za míchání během 15 minut. Vysráží se bílá sraženina. Přidá se dalších 20 ml vody a sraženina odfiltruje a promyje vodou a methanolem. Získá se 0,98 g produktu (76 %), teplota tání: 191 až 195 °C.

Vzorek pro analýzu se připraví rekrystalizací ze směsi dimethylsulfoxidu a methylalkoholu. Jeho teplota tání činí 201 až 203 °C.

UV : $\lambda_{\max} = 250$ (C₂H₅OH)

NMR (d⁶ - DMSO)

Analýza pro C₂₀H₂₇N₄O₆P:

vypočteno: 53,33 % C, 6,07 % H, 12,44 % N, 6,88 % P,

nalezeno: 53,83 % C, 6,09 % H, 12,27 % N, 6,74 % P.

Protivirové vlastnosti

Schopnost NPT 15457 a NPT 15458 potlačit odezvu viru chřipky se stanovuje za použití hemadsorpční zkoušky. Jak může být zřejmé z tabulky 4, výchozí droga NPT 15458, která se takřka úplně štěpí na NPT 15392 (aktivní droga), má podobnou schopnost potlačovat růst viru, jako aktivní droga (NPT 15392). Ve skutečnosti se zdá, že NPT 15458 může být nepatrně účinnější, pravděpodobně v důsledku větší nitrobenčové absorpce NPT 15458. U sukcinyllového derivátu, který se negativně nabíjí při pH 7,2, by se neočekávalo, že vstupuje do buněk tak snadno a může být při tomto postupu méně účinný.

Tabulka 4

Porovnání protivirových vlastností sukcinylnonylhypoxanthinu (NPT 15457) a acetoxy-nonylhypoxanthinu (NPT 15458) s NPT 15392

Droga (g/l)	% potlačení růstu viru chřipky				
	0	0,36 ^a	3,6 ^a	10,8 ^a	36 ^a
NPT 15392 (kontrolní stanovení)	0	20	30	42	73
NPT 15457	0	18	0	18	13
NPT 15458	0	26	40	80	88

^a Koncentrace v nmol/ml.

Imunomodulační účinek

Schopnost acetoxy- (NPT 15458) a sukcinoyxysteru (NPT 15457) sloučeniny NPT 15392 modulovat imunní systém jak *in vitro*, tak *in vivo*, se stanoví za použití následujících systémů:

1. Mitogenu zahrnujícího proliferaci lymfocytů za použití myších slezinných buněk (*in vitro*).
2. Mitogenu vyvolávajícího proliferaci lymfocytů za použití lymfocytů periferní lidské krve (HPBL) (*in vitro*).
3. Zvýšení tvorby aktivních roset (*in vitro*).
4. Zvýšení tvorby IgM protilátky u myši imunizovaných ovčímí červenými buňkami krve (SRBC) (*in vivo*).

1. Údaje uvedené v tabulce 5 jasně dokládají schopnost NPT 15458 zvětšit PHA vyvolanou proliferaci lymfocytů jak se stanovila při vnesení tritiovaného thymidinu. Při koncentraci 50 μ g/ml NPT 15458 se pozoruje přibližně 25% vzestup. Podobný vzestup se pozoruje s 10 μ g/ml NPT 15392.

2. Údaje uvedené v tabulce 6 jasně dokládají, že ekvimolární koncentrace NPT 15457 a NPT 15458 jsou účinné pro zvětšení proliferace lymfocytů vyvolané PHA za použití HPBL. To je zajímavé při pohledu na údaje uvedené v tabulce 9, které ukazují, že HPBL štěpí oba estery na NPT 15392. NPT 15458, který se štěpí ve větším rozsahu než NPT 15457 (viz tabulka 9) je účinnější potenciátor (tabulka 6, 1,48 proti 1,28) transformace vyvolané PHA.

3. Jak může být zřejmé z tabulky 7, jak NPT 15457, tak NPT 15458 jsou účinné pro modulaci tvorby aktivních roset v HPBL. Je zajímavé poznamenat, že v pokusu # 1, kde lymfocyty ošetřené placebo má velmi nízkou úroveň aktivních roset (imunodefekt), NPT 15457 a NPT 15458 jsou tak účinné jako 15392 v obnovení snížené imunity na normální hladinu. V pokusech #2 mají placebo ošetřené kontrolní vzorky mimořádně vysoké hodnoty pro aktivní rosety. V tomto případě NPT 15392 a NPT 15458 jsou schopné snížit vysoké úrovně normálních hodnot a tak dokládají správnost imunomodulačních vlastností těchto drog.

4. NPT 15457, NPT 15458 a "aktivní" droga NPT 15392 se podají myším Balb/c, které byly imunizované ovčímí červenými buňkami krve (SRBC) a stanoví se protilátky vyprodukované k SRBC. Je zajímavé poznamenat, že NPT 15458 a NPT 15392 jsou velmi účinné k modulaci produkce protilátek IgM. NPT 15392 při studii úrovně způsobil 46% zvýšení produkce IgM. Vyšší dávky NPT 15392 jsou příčinou malého zvýšení nebo poklesu proti kontrolním hodnotám. Je zajímavé poznamenat, že NPT 15458, který se převádí na NPT 15392 a vede k alespoň desetinásobně vyšším hodnotám NPT 15392 v krvi (tabulka 10), způsobuje potlačení vzniku IgM (tabulka 8). To se dalo očekávat, protože NPT 15458 způsobuje velmi vysokou úroveň NPT 15392, která se skoro podobá inhibici vzniku IgM. Údaje uvedené v tabulce 8 dokládají imunomodulační aktivitu NPT 15457 a NPT 15458. Mělo by se ještě poznamenat, že účinek NPT 15457 je menší než účinek NPT 15458 a že se převádí méně NPT 15457 na NPT 15392, než je tomu v NPT 15458 (tabulka 10).

T a b u l k a 5

Imunomodulační vlastnosti acetoxynonylhypoxanthinu (NPT 15458): stimulace in vivo proliferace lymfocytů způsobené mitogenem v myších slezinných buňkách

Sloučenina	Koncentrace	Vpraveno cpm		S.I. ^a	D/C
		-PHA	+PHA		
0		(C) 137	64,647	471	-
NPT 15392	10 µg/ml	(D) 117	68,804	588	1,25
NPT 15458	10 µg/ml	(D) 153	66,800	436	0,93
NPT 15458	50 µg/ml	(D) 138	81,297	589	1,25

^aS.I. znamená stimulační index

T a b u l k a 6

Imunomodulační vlastnosti sukcinoxynonylhypoxanthinu (NPT 15457) a acetoxynonylhypoxanthinu (NPT 15458): zvýšení proliferace lymfocytů způsobené mitogenem v lymfocytech periferní lidské krve

Sloučenina	Koncentrace (nmol/ml)	Vpraveno cpm		S.I.	D/C
		-PHA	+PHA		
NPT 15392 ^x	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 15457	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 15458	0	(C) 277	54,015	195	-
	0,036	(D) 214	59,898	280 ^a	1,43
	0,36	(D) 221	63,858	289 ^a	1,48
	3,6	(D) 238	69,055	290 ^a	1,48

^x Hodnoty se stanovily ze tří pokusů.

^a p < 0,05

T a b u l k a 7

Imunomodulační vlastnosti acetoxynonylhypoxanthinu (NPT 15458) a sukcinoxynonylhypoxanthinu (NPT 15457): zvýšení tvorby aktivní E-roset

Sloučenina	Koncentrace (nmol/ml)	% aktivních E-roset (x ± S.E.)	
		+1	+2
Placebo (kontrolní stanovení)	(0)	9,23 ± 2,9	34,2 ± 6,6
NPT 15392 (kontrolní stanovení)	(3,6)	16,2 ± 1,0	-
	(0,36)	-	15,4 ± 2,9 ^a

Tabulka 7 - pokračování

Sloučenina	Koncentrace (nmol/ml)	% aktivních E-roset	($\bar{x} \pm S.E.$)
NPT 15457	(3,6)	$24,8 \pm 6^a$	-
	(0,36)	-	$33,6 \pm 2,4$
NPT 15458	(3,6)	$19,4 \pm 1,0^a$	-
	(0,36)	-	$23,25 \pm 1,24^a$

^a_p < 0,05 proti placebo/kontrolnímu stanovení.

Tabulka 8

Imunologické vlastnosti acetoxynonylhypoxanthinu (NPT 15458) a sukcinoxynonylhypoxanthinu (NPT 15457): potlačení produkce IgM protilátky u myši Balb/c imunizovaných SRBC

Pokus	Látka	Dávka (i.p.)	IgM plakety ($\bar{x} \pm S.E.$)	% z kontrolního stanovení
1	NPT 15392	(1,80 nmol/kg x 4)	41 ± 4	146 ^a
2		(0,18 nmol/kg x 4)	68 ± 2	147 ^a
1	NPT 15457	(1,8 nmol/kg x 4)	19 ± 3	68 ^a
2		(0,18 nmol/kg x 4)	47 ± 3	102
1	NPT 15458	(1,8 nmol/kg x 4)	8 ± 1	28,5 ^a
2		(0,18 nmol/kg x 4)	11 ± 1	23,9 ^a
1	Kontrolní stanovení	(placebo x 4)	28 ± 2	100
2		(placebo x 4)	46 ± 2	100

^a_p < 0,01 ve srovnání k placebo/kontrolnímu stanovení.

Metabolická konverze

Jak může být zřejmé z tabulky 9, inkubace „výchozích drog“ NPT 15457 a NPT 15458 s opičími buňkami Vero (ledvinové buňky africké opice African Green Monkey), játrovým homogenizátem a lymfocyty periferní lidské krve vede ke vzniku „aktivní“ drogy NPT 15392. Konverze NPT 15458 na NPT 15392 se zdá probíhat ve větším rozsahu než konverze NPT 15457 na NPT 15392.

Údaje v tabulce 10 dokládají, že jak NPT 15457, tak NPT 15458, se mohou absorbovat do krve po i.p. podání a že podání NPT 15458 vede k takřka dvanáctinásobně vyšší úrovni NPT 15392 než podání samotného NPT 15392. To se jasně stanoví ze skutečnosti, že NPT 15458 a NPT 15457 mohou produkovat NPT 15392 in vivo a dále, že u alespoň jednoho z těchto derivátů se dosahuje mnohem vyšší hladiny v krvi, která poskytuje větší účinek.

T a b u l k a 9

Vznik NPT 15392 z acetoxynonylhypoxanthinu (NPT 15458) a sukcinoxynonylhypoxanthinu (NPT 15457) biologickým způsobem

Sloučenina		% z NPT 15392 ^a		za dobu (h)
		0	0,5	24
NPT 15392	Buňky Vero	100	-	100
	Játrový homogenozát	100	100	-
	HPBL	100	-	100
NPT 15457	Buňky Vero	0	-	0
	Játrový homogenozát	0	14	-
	HPBL	0	-	18,2
NPT 15458	Buňky Vero	0	-	50
	Játrový homogenozát	0	70	-
	HPBL	0	-	100

^a Stanoveno za použití vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC).

T a b u l k a 10

Vznik NPT 15392 po i.p. podání acetoxynonylhypoxanthinu (NPT 15458) a sukcinoxynonylhypoxanthinu (NPT 15457) myším

Podaná sloučenina ^x	Zvíře [#]	Hladina v krvi ($\mu\text{g/ml} \times 10^3$)		
		NPT 15392	NPT 15457	NPT 15458
NPT 15392	1	0,22	-	-
	2	0,68	-	-
NPT 15457	1	0,47	1,4	-
	2	0,22	0,57	-
NPT 15458	1	8,2	-	0
	2	2,7	-	0

^x(360 $\mu\text{g/kg}$)

Účinek erythro-9-(2-acetoxy-3-nonyl)hypoxanthinu na růst buněk nádoru (leukémie) in vivo

Sloučenina	(Koncentrace)	% potlačení růstu	
		L1210 (myš)	8068 (člověk)
NPT 15458	(10 $\mu\text{g/ml}$)	40	32

Zvýšení produkce protilátky u myši Balb/c imunizovaných SRBC

Droga (dávka v mg/kg)	% stimulace potlačení salinity
Pokus 1	
Salinický roztok	-
NPT-15392 (0,5 mg/kg)	82
NPT-15467 (Formyl-15392) (0,5 mg/kg)	-14
NPT-15458 (Acetyl-15392) (0,5 mg/kg)	-47
NPT-15477 (Propionyl-15392) (0,5 mg/kg)	135
NPT-15483 (Butyryl-15392) (0,5 mg/kg)	-76

Droga (dávka v mg/kg)	% stimulace potlačení salinity
Pokus 2	
Salinický roztok	-
NPT-15467 (Formyl-15392) (0,05 mg/kg)	7
NPT-15458 (Acetyl-15392) (0,05 mg/kg)	-75
NPT-15477 (Propionyl-15392) (0,05 mg/kg)	33
NPT-15483 (Butyryl-15392) (0,05 mg/kg)	-12

T a b u l k a 11

Souhrn biologických vlastností

Vlastnost	NPT 15457	NPT 15458	NPT 15392
Konvertibilita na NPT 15392			
Chemická: pH 9,5	ano	ano	neproveditelné
pH 7,0	ne	ne	neproveditelné
Biologická:			
HPBL	18	100	neproveditelné
Játra	14	70	neproveditelné
Vero	0	50	neproveditelné
Myš	25	100	neproveditelné
Biologický účinek:			
Protivirový (in vitro)	velmi slabý	ano (88 %)	ano (73 %)
Imunomodulace (in vitro)			
Prolif. lymf.	ano (+14-28 %)	ano(+43-48 %)	ano (+12-27 %)
Imunomodulace (in vitro)			
Roseta	ano (+166 %)	ano (+11 %)	ano (+78 %)
Imunomodulace (in vivo)			
SRBC-IgM	střední(0-60)	ano (-72 %)	ano (+46 %)

Pro stanovení vlastností, které jsou diskutovány výše, byly použity dále uvedené postupy.

A. Metody pěstování buněk

A. Rozmnožování buněk Hela nebo Vera

1. Buněčné kultury v 120 cm² baňce se kultivují z dřívější kultury v monovrstvě tímto způsobem:

2. Prostředí se vylíje a monovrstva se dvakrát promyje vždy přibližně 50 ml salinického fosfátového pufru neobsahujícího vápník a hořčík (PBS) o pH 7,2.

3. 1 ml roztoku trypsinu s EDTA, obsahujícího 0,5 g trypsinu (1 : 250) g EDTA/litr vyváženého solného roztoku (HBSS) bez obsahu kationů dvojmocného vápníku a hořčíku, se přidá za teploty 37 °C do každé baňky a disperguje nad monovrstvou za opatrného protřepávání.

4. Baňky se potom umístí v inkubátoru za teploty 37 °C přibližně 3 až 5 minut, v závislosti na době potřebné k vytěsnění buněk. Vyžaduje se ruční protřepávání.

5. Do každé baňky se přidá 10 ml růstového media a buňky se dispergují nasáváním suspenze do pipety a jejím vypouštěním. To se opakuje desetkrát.

6. Obsah řady buněk se slije a buňky v suspenzi se zředí růstovým mediem na 7 až $8,5 \cdot 10^4$ buněk na mililitr.

7. Růstové medium sestává z těchto složek: Minimální základní prostředí Eagles (MEM) s Earleovou solí a HEPES pufrem doplněné dále uvedenými látkami vztaženými na 100 ml MEM: 10 ml fetálního telecího séra (konečná koncentrace = 10 %), 1 ml l-glutaminu (200 molární) 1 ml 10 000 m.j. penicilinu, 10 000 μ g streptomycinu a 10 000 m.j. neomycinu ve formě směsi.

8. Buňky dřívější kultury se kultivují v Costarově misce pro tkáňové kultury obsahující 24 článků s rovným dnem, kde každý článek má objem 3 ml. Do každého článku se přidá (1 ml) suspenze kultury buněk.

9. Monovrstvy se použijí ke zkoušce, když dosáhnou vzrůstu, kdy skoro splynou (přibližně 1 až 2 dny).

10. Oddělené buňky se použijí pro udržení buněčných linií. Udržovací prostředí sestává z MEM a přísad (viz stupeň 7) s FSC sníženou na 5% konečnou koncentrací.

B. Červené krevní buňky

1. Veškerá krev se získává kardiatickou punkturou ze samců morčat kmene Hartly.

2. Přibližně 10 ml veškeré krve se smíchá s 25 ml Ålserverova roztoku a může se skladovat za teploty 4 °C až 1 týden.

3. Těsně před použitím se červené krevní buňky třikrát promyjí salinickým fosfátovým pufrem (PBS), pH 7,2.

4. Každé promytí se dosahuje odstředěním suspenze červených krevních buněk během 10 minut za 450 G při teplotě místnosti.

5. Suspenze 0,4 % (objemově) červených krevních buněk se připraví s Hanksovým roztokem HBSS.

C. Pěstování virů na vejcích

A. Infikace

1. Slepíčí vajíčka fertilní devět až deset dní se prosvítí ke stanovení životaschopnosti a vzdušný prostor se vyznačí na skořápce tužkou. Problematická vajíčka (porušení pohybu nebo odbarvení) se vyřadí.

2. Povrch skořápek se desinfikuje 70% ethanolem a nechá uschnout.

3. Skořápkou se prorazí pomocí sterilního prorážáče vajec malý otvor přibližně 6,3 mm, v tužkou naznačeném kruhu nad vzdušným prostorem každého vajíčka.

4. Otvorem se naočkuje 0,1 ml suspenze různých virů, 10^2 až 10^3 EID₅₀/ml, která se zavede 1 ml tuberkulinovou injekční stříkačkou pod úhlem 45° do dutiny zárodečného výchlípku.

5. Přitom je nutné dát pozor, aby se nezranil zárodek nebo váček žloutku.

6. K uzavření otvoru se použije 2,54 cm kousku plastické folie a každé vajíčko se označí příslušným virem, běžným číslem vajíčka a datem.

7. Vajíčka se inkubují za teploty 35 až 37 °C po dobu 2 až 5 dnů v závislosti na rychlosti růstu virů. Doba inkubace a teplota se zaznamenávají společně s jinými případnými údaji pro každou šarži.

B. Získání allantoisových tekutin

1. Na konci inkubačního období se vajíčka ochladí na 3 až 4 hodiny na teplotu 4 °C, aby se zamezilo vytékání do dutiny zárodečného výchlípku během postupu získání viru.

2. Povrch skořápek se opět desinfikuje 70% ethanolem a nechá oschnout.

3. K odstránutí vrchu skořápky podél čáry vyznačené tužkou se použije sterilních nůžek a membrána se odstraní sterilními kleštěmi.

4. Kleště se opatrně vysunou mezi embryo a blánu skořápky a embryo se posune ke straně za vzniku "kapsy" allantoisové tekutiny. Je zapotřebí, aby se neprorazila vnitřní plodová blána (s výjimkou případů, kdy se má také získat emnionická tekutina) a aby se snížilo na minimum roztrhnutí placentální arterie.

5. K shromáždění allantoisové tekutiny se použije sterilní 10 ml pipety s mechanickým vakuovým balónkem a tekutina se přenesse do sterilní zkumavky v odstředivce. Z každého vajíčka se může získat přibližně 5 až 8 ml tekutiny.

6. Získaný materiál se odstřeďuje při 1 200 G po dobu 10 minut za teploty 4 °C. Vrchní vrstva se přenesse do sterilních zkumavek.

7. Vzorky se odeberou z každé jímky k titraci a zkoušky sterility. Zbývající suspenze se beze zbytku rozdělí do sterilních zkumavek na 2 ml séra a označí kmenem, číslem šarže a datem.

8. Alikvoty se bezprostředně zmrazí kapalným dusíkem a ukládají za teploty -70 °C v ultrafrizeru nebo kryoprizeru chlazeném kapalným dusíkem.

D. Rozmnožování viru v tkáňové kultuře

A. Zamoření

1. Za 24 až 48 hodin se vyberou pro použití monovrstvové kultury příslušného typu buněk, které jsou obvykle v 250 cm² baňce s použitelnou tkáňovou kulturou, a přitom jen splývají.

2. Veškeré zamořování a získávání se provádí v biologicky bezpečnostní pracovně a používá se pouze mechanického pipetovacího zařízení. Přitom se zachovávají sterilní technické postupy.

3. K nahrazení růstového prostředí v kulturách určených k zamoření se použije 25 ml udržovacího prostředí. Kontrolní kultury také obdrží 25 ml udržovacího prostředí.

4. Očkovací virus se zředí MEM prostým sérem podle informace poskytnuté ze zdroje nebo z titrace předchozí šarže a ke každé kultuře (s výjimkou kontrolní kultury) se přidá 0,5 ml tohoto viru.

5. Kultury se inkubují za teploty 37 °C ve vlhké atmosféře z 5 % oxidu uhličitého a 95 % vzduchu po dobu 48 až 72 hodin s denním pozorováním cytopatických účinků (CPE) charakteristických pro každý virus.

B. Získávání

1. Kultury se odstraní k získávání, když CPE dosáhne 3 až 4+ bodů.

- 0 - nepozorují se cytopatické účinky
- 1+ - 25 % buněk vykazuje cytopatické účinky
- 2+ - 50 % buněk vykazuje cytopatické účinky
- 3+ - 75 % buněk vykazuje cytopatické účinky
- 4+ - 100 % buněk vykazuje cytopatické účinky

2. Kultury se zmrazí a třikrát rozehrějí aby se rozštěpila a vytlačila vrstva buněk. Po třetím roztání se kulturní kapalina přesene do sterilní zkumavky odstředivky a odstřeďuje při 300 G 30 minut, aby se odstranily pozůstatky buněk. Suspenze viru se přezkouší kontaminací bakteriemi.

3. Vrchní vrstva se bezprostředně rovnoměrně rozdělí (0,5 až 1 ml) do 2 ml sterilních zkumavek na sérum a zmrazí kapalným dusíkem.

4. Pro titraci se monovrstva kultury připraví na desky s 24 články s rovným dnem pro tkáňovou kulturu a infikuje se takto:

a) Řada desetinásobných zředění viru se provede v chladném udržovacím prostředí 5% fetálním telecím sérem (FCS) (10^{-1} až 10^{-7}).

b) Jeden ml z každého ředění se přidá do jednotlivých článků v trojím provedení.

c) Kontrolní kultury obsahují pouze udržovací prostředí jsou v tom zahrnuty.

5. Kultury se inkubují 48 hodin za teploty 37 °C ve vlhké atmosféře 5 % oxidu uhličitého a 95 % vzduchu a vrstvy buněk se bodují, jak již bylo popsáno. TCID₅₀ titr se vypočítá podle titrační metody Reeda a Muncha.

E. Hemadsorpční zkouška

1. Těsně před provedením HAd zkoušky se prostředí dekantuje z misek pro buněčnou kulturu.

2. Ke každému zdroji kultury se přidá 1 ml udržovacího prostředí.

3. Dvě serie kontrolních kultur se přidají k samotnému udržovacímu prostředí.

4. Testovací kultury a jedna z kontrolní serie se bezprostředně naočkují 0,1 ml zředěného virového přípravku. (Zavedené titry jsou specifikovány jako předchozí HAdFFU zkoušky). HAdFFU znamená hemadsorpční jednotky tvořené fokusy.

5. Další serie kontrolního provedení se udržují neinfikované, přičemž se přidává samotný MEM jako neškodná innokulace.

6. Kultury se inkubují za teploty 37 °C po dobu 16 až 18 hodin, pokud není uvedeno jinak.

7. Po době naočkování se prostředí dekantuje a buňky jednou promyjí pufrům PBS při pH 7,2.

8. Ke každému článku se přidá 5/10 ml RBC suspenze a kultury se nechají 30 minut za teploty místnosti.

9. RBC suspenze se potom dekantuje a kultury se promyjí dvakrát nebo třikrát puřem PBS, aby se odstranilo vše a zvláště nadbytek RBC.

10. Konečně se ke každému článku přidá 1,0 ml Hankova roztoku HBSS.

11. Počet fokusů původně hemadsorbovaného RBS se stanoví za použití mikroskopu s inverzí fází Nikon s čtyřnásobně zvětšujícím objektivem.

12. Ve všech případech se k stanovení počtu buněk vybere minimálně pět nahodilých oblastí.

13. Počet HAd fokusů se stanoví pomocí analyzátoru (Bausch & Lomb Omnicon Alpha Image Analyzer).

14. Obraz podle mikroskopu se promítá na obrazovku Vidicon a také se převádí na televizní obrazovku tak, že operátor může stanovit a odečíst chyby v důsledku pozůstatků buněk. Pokusy se stanovují podle šedé hladiny a velikosti obrazu.

15. K eliminaci počtu výsledných neadsorbovaných RBC, se nadměrná velikost vypočteného modulu programuje na obrazovku, aby prošly jednotlivé RBC.

16. Statistická analýza zahrnuje analýzu údajů za použití analýzy odchylky od soustavy v navrženém modelu. Zdroj odchylky může být způsoben zpracováním, buňkami při zpracování a experimentální chybou v důsledku okolností v oblasti buněk střední hodnoty infikovaných buněk v oblasti a standardní chyby střední hodnoty se vypočítají pro každý článek. Střední hodnoty a standardní chyby se také vypočítají pro každé ošetření jímáných buněk v souhrnu po všech ošetřeních dohromady. Střední hodnoty infikovaných buněk na každé ošetření se srovnají s kontrolním stanovením za použití Dunnetova násobného porovnávacího testu bez ohledů na celkový F-test pro ošetření (viz tabulka dále).

T a b u l k a

Kontrolní stanovení			Ošetření 1		
Článek 1	Článek 2	Článek 3	Článek 1	Článek 2	Článek 3
F 11 ^x	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
$\bar{x}_1 \pm SE_1$	$\bar{x}_2 \pm SE_2$	$\bar{x}_3 \pm SE_3$	$\bar{x}'_1 \pm SE_1$	$\bar{x}'_2 \pm SE_2$	$\bar{x}'_3 \pm SE_3$
souhrn $\bar{x}_C \pm SE_C$			$\bar{x}'_T \pm SE'_T$		
n = 9			n = 9		

^x F 11 představuje oblast + .

F. Příprava lymfocytů periferní lidské krve (HPBL)

A. Příprava Ficcol - Hypaque separačního prostředí

1. 22,5 g Ficollu 400 (Pharmacia, molekulová hmotnost asi 400 000) se rozpustí ve 200 ml destilované vody. Když většina materiálu přejde do roztoku, objem se potom upraví destilovanou vodou na 250 ml.
2. 34 g Hypaque (natriumdiatrizoátu, Sterling Organics, molekulová hmotnost asi 636) se rozpustí ve 100 ml destilované vody.
3. Roztoky se potom sterilně filtrují 0,45 μ m mikroporézním filtrem a skladují v sterilních zásobnících na teploty 4 °C bez přístupu světla.
4. Pracovní roztok se připraví smícháním 10 ml roztoku Hypaque s 24 ml roztoku Ficollu. Směs se zahřeje na 25 °C za nepřetržitého míchání.

B. Oddělení PBL od veškeré krve

1. Vzorky lidské krve se získají veinipunkturou do heparinizovaných 20ml vzducho-prázdných zkumavek. 15 až 20 ml nezředěné krve se opatrně převrství rovným objemem Ficoll-Hypaque roztoku v sterilní 50ml polykarbonátové zkumavce pro odstředivky za použití aseptických podmínek.

2. Připravené vzorky se odstřeďují při teplotě 25 °C za přetížení 400 G po dobu 30 minut. Odstředěný bílý pás na rozhraní se asepticky odsaje do 50ml sterilní zkumavky pro odstředivku a přidá 10 až 20 ml RPMI-1640. Buňky se jednou promyjí za teploty 25 °C a pak odstředí při 400 G během 10 minut za teploty 25 °C.

3. PBL ve formě pelet se opět suspenduje v 1 ml RPMI na každých 8 ml celkové krve původně použité a počítá na Coulterově počítací. Koncentrace se upraví pomocí RPMI-1640, které obsahuje glutamin a antibiotika. Buňky se udržují za teploty místnosti, dokud se ne-použijí.

G. Stimulace HPBL a PHA a LPS

1. 10 až 40 ml celkové krve se odebere do heparinované zkumavky od zdravých dobrovolníků.

2. Lymfocyty se oddělí od krve uvedené výše za použití Ficoll-Hypaque separační techniky.

3. Pomocí RPMI-1640 se připraví různé koncentrace testované sloučeniny.

4. Koncentrace lymfocytů se upraví na 2×10^6 /ml RPMI-1640.

5. Lymfocyty se inkubují s testovanou sloučeninou 90 minut za teploty 37 °C.

6. Ovčí červené krevní buňky (SRBC) (1 až 2 týdny staré) se třikrát promyjí pufrům PBG a zředí na konečnou koncentraci 0,5 % inj. RPMI-1640.

7. Reakční zkumavky se naplní tak, aby obsahovaly:

0,2 ml lymfocytů (2×10^6)
0,2 ml 9% Ficollu v RPMI-1640
0,2 ml SRBC (0,5 % v RPMI-1640).

8. Výše uvedené reaktanty se odstřeďují za přetížení 200 G 5 minut při teplotě místnosti.

9. Sediment se potom opět opatrně suspenduje a 10 litrový vzorek se umístí v hemocytometru.

10. Pomocí mikroskopu se potom spočítá počet roset, přičemž některé lymfocyty, které mají 3 nebo více připojených červených buněk se počítají jako rosety.

H. Buněk tvořící E-rosety

A. Příprava mitogenu

1. Prášek lipopolysacharidu B nebo fytohemaglutinu P se odváží a rozpustí v RPMI-1640 na koncentraci $1\,000\ \mu\text{g/ml}$ (tj. $1\ \text{mg/litr}$) a sterilně filtruje na $0,45\ \mu\text{m}$ mikroporézním filtrem.

2. Roztoky se rozdělí na rovné díly (1ml/zkumavku) za aseptických podmínek do označených sterilních zkumavek pro nízké teploty a zmrazí. Vzorky se po částečném použití znovu nezmrazují, ale mohou se skladovat jeden nebo dva dny za teploty $4\ ^\circ\text{C}$. Lyofilizovaný prášek se udržuje v chladničce za teploty $4\ ^\circ\text{C}$.

B. Příprava kultur

1. PBL se připraví jako v SOP + I - 004 v RPMI-1640 bez séra při doplnění glutaminem a antibioticky-antimykotickým roztokem (GIBCO). Pomocí šmíkanálového automatického mikropipetovacího zařízení (Flow Labs.) vybaveného sterilními špičkami se ke každému článku 96-člankové desky pro mikrotestování kultur (CoStar Plastics) přidá $0,1\ \text{ml}$ na článek.

2. Mitogenní roztoky se rychle nechají roztát a čtyřikrát zředí na požadovanou koncentraci pomocí RPMI-1640.

3. Testované sloučeniny se připraví pro použití jako SOP # C-002 za použití RPMI-1640 jako ředidla a zředí se čtyřikrát na konečnou požadovanou koncentraci.

4. $50\ \mu\text{l}$ každého naředění nitrogenu a/nebo testované sloučeniny se přidá k šesti kulturám. Čistý RPMI-1640 se použije ve stejném množství v kontrolních kulturách v celkovém objemu $0,2\ \text{ml}$ na článek.

5. Kultury se inkubují za teploty $37\ ^\circ\text{C}$ ve vlhké atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého a 95 % vzduchu (pH asi 6,0 až 7,0) po dobu 48 hodin. Buňky se potom značí $1,85 \cdot 10^4/\text{s}$ na baňku pomocí $^3\text{H-TdR}$ (thymidin) po dobu dalších 18 hodin. Buňky se získávají pomocí zařízení k získání mnohonásobného automaticky odebíraného vzorku (M.A.S.H.). Neadherentní buňky se odsají na filtru ze skleněných vláken při shrnutí 0,9 % salinickým roztokem (desetinásobné propláchnutí) a buňky se uvolní destilovanou vodou (dvacetinásobné dobré propláchnutí). Podíl zbavený těkavých složek se důkladně suší na vzduchu, zbytek buněčných usazenin se oddělí od podílu zbaveného těkavých složek a každý vzorek umístí do skleněné scintilační fioly objemu $3,53\ \text{ml}$. Scintilační tekutý koncentrát (Scintiprep¹, Fisher Chemicals) se zředí v poměru 1 : 50 toluenem jakosti pro scintilaci (Pachard) a do každé fioly se přidá $1\ \text{ml}$. Vzorky se hodnotí kapalinovou scintilační spektroskopií a údaje se vyjadřují jako počet impulzů za minutu na testovanou skupinu.

I. Imunozkouška

A. Příprava NPT 15392

1. Roztok obsahující $500\ \mu\text{g/ml}$ NPT 15392 se připraví přidáním předem odváženého množství práškové drogy k sterilnímu PBS a roztok se sonifikuje po 30 minut.

2. Vlnová délka spektrofotometru (GCA/MePherson double beam) se nastaví na $250\ \text{nm}$.

3. NPT 15392 se zředí 1 : 10 $0,1$ normální kyselinou chlorovodíkovou.

4. 15 ml 0,1 normální kyseliny chlorovodíkové se vylije do kádinky. Tento roztok se používá k vyplachování kyvet. Dvě kyvety se naplní 0,1 normální kyselinou chlorovodíkovou a odečte se vlnová délka. Absorbce by měla být v rozmezí 0,001 až 0,005 od vynulované hodnoty.

5. Vzorkovací kyveta se vyprázdní a do ní se vnese zředěný roztok drogy.

6. Zaznamenaná se absorbce a vypočítá se koncentrace. Přitom se použije tohoto vzorce:

$$\frac{A \text{ (absorbce)}}{11,31} \times \text{faktor zředění} \times \text{atomová hmotnost (278)} = \text{g/ml}$$

B. Před dnem 0

1. Roztok drogy NPT 15392 se připraví rozpuštěním 500 μg NPT 15392 na ml PBS.
2. Koncentrace se přezkouší podle odstavce A tohoto popisu.
3. Zásoba se rovnoměrně rozdělí do 1 ml vzorků a skladuje za teploty -20°C po několik měsíců.

4. Roztok se nechá roztát a zředí na požadovanou koncentraci.

C. Agarózové základní desky se připraví takto:

1. 1,4 % suspenze agarózy v PBS (7 g v 500 ml) se umístí v autoklávu na 15 minut.
2. Za použití Cronwellovy injekční stříkačky se třímililitrový objem roztavené agarózy asepticky rozdělí do Petriho misek Falcon + 1006 a vířivým pohybem upraví do formy rovné vrstvy.
3. Tyto desky se mohou skladovat až jeden týden před použitím za teploty 4°C . Desky se skladují v inverzní poloze (agar na vrchu desky).

D. Příprava séra morčete

1. Kardiatickou punkturou se odebere 10 ml krve ze 2 až 6 morčat a krev se vnese do 50 ml zkumavek pro odstřeďování Falcon + 2070 bez antikoagulantu.
2. Tyto zkumavky se inkubují po dobu 45 minut za teploty 37°C k získání sraženiny.
3. Zkumavky se potom odstraní z inkubátoru a dají na 30 minut na led, aby se zmenšil objem sraženiny.
4. Sérum se asepticky vylije z každé zkumavky, spojí a rozdělí na 1 ml alikvoty a skladuje za teploty -70°C až do použití.

E. Imunizace, den 0

1. Myši se imunizují takto: Ovcím Hyland Labs se týdně odebírá krev (ovce + 23). Krev se asepticky shromažďuje ve dvou objemech Alseviars na jeden objem krve.
2. Pět desetin mililitru ovčí krve v Alseviars se třikrát promyje sterilním PBS - v klinické odstředivce IEC, za nastavení + 4 (otáčky 2 800/min) po dobu 10 minut při teplotě místnosti.
3. Pelety se opět suspendují v poměru 1 : 10 ve sterilním PBS.

4. Coulterův počítací model Z, se kalibruje podle instrukce pro ruční provoz.
5. Ke stanovení počtu buněk na Coulterově počítací je zapotřebí zředění 1 : 10 000 a to se dosáhne nejprve zředěním 1 : 100 v PBS a potom zředěním tohoto roztoku 1 : 10 isotonickým roztokem. Coulterův počítací je nastaven na prahovou hodnotu + 5.
6. Stanoví se počet buněk a skladovaný roztok zředí na 4×10^7 buněk na mililitr. Tato konečná suspenze se používá k imunizaci.
7. Každá myš se imunizuje i.v. injekcí do laterální části žíly (zahřáté na 50°C na vodní lázni k roztažení žíly) s 0,1 ml suspenze SRBC. Konečná koncentrace SRBC je 4×10^6 na myš.

F. Ošetřování

1. Myši se ošetřují i.p. injekcí nultého, prvního, druhého a třetího dne. Injekční stříkačka (objemu 1 ml) je vybavena jehlou 1,27 cm rozměru 26. Jehla se zavádí v 45° úhlu podél pravé strany linea alba. 0,2 ml objem obdrží dvě skupiny vystavené působení drog a kontrolně ošetřená skupina.

2. Skupiny vystavené působení drog dostanou 0,2 ml roztoku NPT 15392 požadované koncentrace. U myši o hmotnosti 20 g jde o $5 \mu\text{g/ml}$.

G. Příprava sleziny, den 4

1. Sleziny se odstraní asepticky a individuálně umístí do zkumavky pro tkáňovou kulturu Falcon + 2025 obsahující 3 ml MEM. Zkumavky se potom skladují v ledu.

2. Sleziny se homogenizují ve stejné zkumavce teflonovým tloučkem připojeným k motoru s proměnnou rychlostí (G. K. Heller, spojeným se zařízením pro řízení motoru (G. K. Heller GT-21) nastaveným na + 6:

3. Doba a průběh homogenizace by měly být u každého vzorku stejné.

4. Vzorky se potom filtrují sítím z nerezavějící oceli o velikosti ok $40 \mu\text{m}$ do standardních zkumavek pro tkáňové kultury. Síto se propláchne 3 ml MEM a suspenze buněk se skladuje v ledu.

5. Proveďte se zředění 1 : 1 000 pro spočítání buněk na Coulterově počítací tím, že se nejprve ředí 1 : 1 000 s PBS a potom 1 : 10 isotonickým roztokem.

6. Dostane se počet buněk. Skladovaná suspenze se zředí na 1×10^7 buněk na mililitr. Coulterův počítací je nastaven na prahovou hodnotu 10. Červené buňky se odstraní třemi kapkami isotonického roztoku Zap.

H. Příprava horního agarů (0,7 %)

1. 0,35 g agarózy a 0,53 g práškového MEM se vnese do Erlenmeyerovy baňky a potom přidá 50 ml destilované vody.

2. Roztok se zahřívá v autoklávu 15 minut na teplotu 121°C za tlaku 105 kPa a potom se umístí na vodní lázni o teplotě 45°C na dobu 5 minut. Hodnota pH roztoku se upraví zhruba na 7,2 přidáním hydrogenuhličitanu sodného (0,1 ml Na_2CO_3).

3. 1 ml alikvoty se dispergují v 5 ml zkumavce pro tkáňovou kulturu, která byla předem umístěna na vodní lázni. Přitom se použije několik zvláštních zkumavek pro opakování pro případ chyby v očkování.

I. Příprava 10 % SRBC roztoku

1. 5 ml ovčí krve (stejně šarže, jako se použila k imunizaci) se promyje třikrát s PBS za použití klinické standardní odstředivky IEC o rychlosti + 4 (otáčky 2 800/min) po dobu 10 minut.

2. Po třetím promytí se buňky opět suspendují v desetinásobném objemu PBS než je objem použitých buněk, tj. 0,5 ml SRBC se doplní do 5 ml s PBS.

J. Očkování

1. Agarové desky se vyjmou z chladničky a nechají ohřát na teplotu místnosti. Desky se značí trojnásobně pro každou pokusnou skupinu.

2. Zkumavky naplněné agarem se vyjmou z vodní lázně a do každé takové zkumavky se přidá 0,1 ml 10% SRBC a 0,1 ml suspenze slezinových buněk. Zkumavky se míchají na mixeru Vortex.

3. Obsah zkumavek se hned vylije na desky s agarovou bází a otáčí vířivým pohybem dokud se nevytvoří hladká vrstva. Desky se umístí na úroveň povrchu dokud agar neztuhne.

4. Desky se inkubují za teploty 37 °C ve vlhké atmosféře tvořené 5 % oxidu uhličitého a 15 % vzduchu po dobu 90 minut.

5. Doplněk z morčete (viz. příprava, část D) se vyjme z ledničky, nechá roztát při teplotě místnosti a zředí 1 : 10 s PBS.

6. Desky se potom vyjmou z inkubátoru a ke každé desce se přidá 1 ml zředěného doplňku.

7. Desky se potom znovu inkubují 30 až 45 minut za teploty 37 °C. Desky se potom vyjmou z inkubátoru a spočítají za použití šikmého osvětlení.

8. Desky se mohou skladovat při 4 °C v inverzní poloze a spočítat do 24 hodin později.

Souhrn terapeutického použití v pracovních příkladech

Bylo doloženo, že předmětné sloučeniny podle vynálezu potlačují reprezentativní vzorky viru RNA za použití standardní techniky pro tkáňové kultury. V případě RNA viru, chřipkového viru náležejícího k podtypu A bylo ukázáno, že je potlačován při použití hemadsorpční techniky. U několika derivátů řady NPT 15457 a NPT 15458 se ukazuje, že potlačují chřipkové viry za koncentrace v rozmezí od 3,6 do 360 nmol/ml.

Další členové třídy virů RNA jsou uvedeny v tabulce 6 a jsou odpovědní za určitá onemocnění. Ze všech chorob na světě je, jak známo, alespoň 25 % způsobeno viry. Kromě toho u řady izolovaných virů bylo dokázáno, že způsobují nádory. Tak se může očekávat, že protivirové přípravky mají určité protinádorové vlastnosti, například vlastnosti antileukemické.

Účinek jednoho z těchto přípravků, NPT 15458, jako inhibitoru růstu abnormálních lymfocytů, byl stanoven. Je pozoruhodné, že NPT 15458 je schopen zabránit proliferaci leukemických lymfocytů (L-1210 řady buněk) u myši v tkáňové kultuře. 40% potlačení buněk L-1210 se dosahuje pomocí 10 µg/ml NPT 15458.

Konečně údaje uvedené v tabulce 3 ukazují, že při normální tělesné hodnotě pH (7,2) mají sloučeniny dobrou chemickou stabilitu, ale v zásadě oblasti pH se štěpí za „účinnou“ látku 15392. Jak se sezná z tabulky 9, estery a zvláště NPT 15458 se štěpí při inkubaci s živočišnou tkání na NPT 15392. To předurčuje, proč předmětné sloučeniny, tedy „výchozí

drogy", mají shodný biologický účinek. Kromě toho údaje uvedené v tabulce 10 jasně dokládají, že sloučeniny podle vynálezu mají alespoň dvanáctinásobně vyšší hladinu NPT 15392 v krvi, než když se NPT 15392 samotný podává myším. Přitom vzniká biologicky "účinná" látka, když se NPT 15458 intraperitoneálně zavede injekcí. Dále je možné k tabulce 9 poznamenat, že buňky Vero (ledvinové), játrový homogenizát a HPBL vždy štěpí zavedenou sloučeninu na biologicky účinnou sloučeninu NPT 15392.

Třída sloučenin podle vynálezu specificky potlačuje viry, moduluje (mění nebo potlačuje) imunní odezvu a zabráňuje růstu leukemických lymfocytů. Na základě pokusů in vitro a vyšší hladiny v krvi dosahované s těmito sloučeninami, ve srovnání s NPT 15392, které dokládá účinek nad koncentrací v rozmezí 0,01 až 100 $\mu\text{g/ml}$, je předpokládáné dávkové rozmezí účinné pro savce 0,005 až 50 mg/kg.

Směsi

Sloučeniny podle tohoto vynálezu se mohou podávat savcům v dávce 1 až 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a může se předvídat, že budou účinné i při úrovni tak nízké jako 0,005 mg/kg.

Sloučeniny se mohou podávat ve formě tablet nebo kapslí člověku a zvířatům a pokud to rozpustnost dovoluje, také ve formě vodných sirupů nebo jako roztoky v oleji, nebo - pokud jsou sloučeniny nerozpustné - jako suspenze. Typické farmaceutické směsi jsou popsány dále.

Kapsle

NPT 15458	0,1 až 500 mg
Avicel pH 101	do 800 mg

(mikrokrystalická celulóza)

Suspenze

Vodná suspenze se může zpracovat pomocí řady suspenzačních prostředků, do kterých se vpraví účinná látka. Mezi suspenzační prostředky se zahrnují takové látky, jako je natriumkarboxymethylcelulóza, alginát sodný, tragant, Avicel RC-591 (mikrokrystalická celulóza), methylcelulóza, Veegum a xanthanová guma. K suspenzačním prostředkům se mohou přidávat takové látky, jako jsou sladidla, ochucovadla, barviva, ochranné prostředky, ochranné koloidy a dispergační prostředky.

Sirupová směs

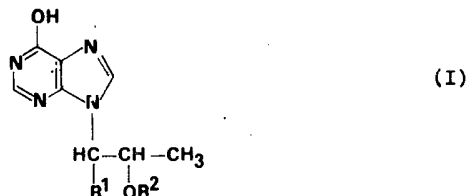
NPT 15458	0,05 až 250 mg (nebo maximální úroveň rozpustnosti)
Kukuřičný cukr	3,25 g
Destilovaná voda	0,05 g
FD a C Red 40	0,00175 g
Sodná sůl sacharinu	0,00250 g
Alkohol U.S.P.	0,08 g
Methylparaben U.S.P.	0,005 g
Glycerin	0,001 g
Třešňová esence	0,31225 g
Ovocná esence	0,00825 g
Destilovaná voda podle potřeby do	5 ml

Tablety

NPT 15458	0,1 až 500 mg
Avicel pH 101	130 mg
Škrob, modifikovaný	20 mg
Stearát hořečnatý U.S.P.	5,5 mg
Polyvinylpyrrolidon	22 mg
Kyselina stearová U.S.P.	30 mg

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby esterů hydroxyalkylpurinů obecného vzorce I

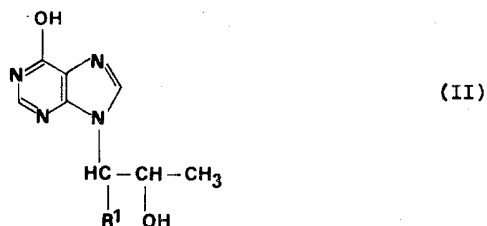


kde

R^1 znamená alkylovou skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku a

R^2 znamená alkanoylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku, která je popřípadě v poloze Ω substituována karboxylovou skupinou nebo alkanoylovou skupinu s 2 až 5 atomy uhlíku, která je substituována v poloze α aminoskupinou,

vyznačující se tím, že se nechá reagovat hydroxyalkylpurin obecného vzorce II



kde

R^1 má výše uvedený význam,

s kyselinou odpovídající alkanoylovému zbytku nebo s jejím anhydridem, za vzniku sloučeniny obecného vzorce I:

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látky použije hydroxyalkylpurinu obecného vzorce II, ve kterém R^1 znamená hexylovou skupinu s přímým řetězcem.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se hydroxyalkylpurin nechá reagovat s N-karbobenzoxylglycinem nebo N-karbobenzoxyalaninem v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu a potom se N-karbobenzoxyskupina odstraní hydrolýzou.