

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.09.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.09.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0012094**
(33) Země priority: **FR**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.06.2003**
(Věstník č. 6/2003)
(86) PCT číslo: **PCT/FR01/02918**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/024754**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 814

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 08 B 37/00
A 61 K 31/715

(71) Přihlašovatel:
SANOFI-SYNTHELABO, Paris, FR;

(72) Původce:
Duchaussoy Philippe, Toulouse, FR;
Herbert Jean-Marc, Tournefeuille, FR;
Petitou Maurice, Paris Cedex, FR;
Savi Pierre, Seysses, FR;

(74) Zástupce:
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Polysacharidy s antitrombotickou aktivitou
obsahující alespoň jednu kovalentní vazbu s
biotinem nebo derivátem biotinu a jejich použití
při léčení

(57) Anotace:
Popisují se nové syntetické polysacharidy a antitrombotickou aktivitou obsahující alespoň jednu kovalentní vazbu s biotinem nebo derivátem biotinu a způsob použití avidinu nebo streptavidinu pro neutralizaci těchto polysacharidů.

Polysacharidy s antitrombotickou aktivitou obsahující alespoň jednu kovalentní vazbu s biotinem nebo derivátem biotinu a jejich použití při léčení

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových syntetických oligo- a polysacharidů, které obsahují alespoň jednu kovalentní vazbu k biotinu nebo derivátu biotinu a mají antikoagulační a antitrombotickou farmakologickou aktivitu heparinu.

Dosavadní stav techniky

Heparin katalyzuje zejména prostřednictvím antitrombinu III (AT III) inhibici dvou enzymů, které jsou zahrnuty do kaskády srážení krve, konkrétně faktoru Xa a faktoru IIa (nebo trombinu). Přípravky obsahující hepariny s nízkou molární hmotností (LMWH) obsahují řetězce 4 až 30 monosacharidů a mají schopnost působit selektivněji vzhledem k faktoru Xa, než k trombinu.

Je známo, že inhibice faktoru Xa vyžaduje připojení heparinu k AT III prostřednictvím domény vážící antitrombin (Doména A) a že inhibice faktoru IIa (trombinu) vyžaduje připojení k AT III prostřednictvím domény A a k trombinu prostřednictvím hůře definované vazebné domény (Doména T).

Syntetické oligosacharidy odpovídající doméně Doména-A heparinu jsou známy. Jsou popsány například v Patentech EP 84 999 a EP 529 715, Mezinárodních patentových přihláškách WO 99/36428 a článku *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, 6, 1509-1516. Tyto syntetické oligosacharidy selektivně inhibují prostřednictvím antitrombinu III koagulační faktor Xa, aniž by měly jakoukoli

aktivitu vůči trombinu. Mají antitrombotickou aktivitu při žilní trombóze.

Syntetické oligosacharidy schopné inhibovat trombin a faktor Xa postřednictvím aktivace AT III jsou popsány v Mezinárodních patentových přihláškách WO 98/03554 a WO 99/36443.

Nové biologicky aktivní sulfatované a alkylované deriváty polysacharidů jsou popsány v těchto patentových přihláškách. Jsou to zejména antikoagulanty a antitrombotika. Ukázalo se zejména, že tyto sulfatované a alkylované polysacharidy mohou být účinnými antitrombotickými a antikoagulačními činidly v závislosti na uspořádání alkylových skupin a sulfátových skupin, které jsou vázány na páteři sacharidu. Obecněji se ukázalo, že prostřednictvím přípravy polysacharidové sekvence je možné přesně nastavit aktivitu typu GAG za účelem získání velmi aktivních produktů, které mají antikoagulační a antitrombotické farmakologické vlastnosti heparinu. V porovnání s heparinem mají tu výhodu, že mají specifickou strukturu a nereagují s faktorem 4 krevních destiček, což způsobuje trombocytopenické účinky heparinu.

Použití některých produktů popsanych v patentových přihláškách číslo WO 98/03554 a WO 99/36443 a patentu EP 529 715 humánní medicíně se však může ukázat jako problematické, zejména pokud mají tyto produkty dlouhý poločas rozpadu. V oblasti prevence nebo léčení trombózy výše uvedenými prostředky se musí upravit nebo udržovat tekutost krve, aby se předešlo vzniku krvácení.

Je to proto, že je dobře známo, že krvácení se může u pacienta spustit při jakékoli nehodě. Může být také nutné u pacienta léčeného antitrombotickou léčbou chirurgicky zasáhnout. Dále se mohou při chirurgických zákrocích použít antikoagulanty ve

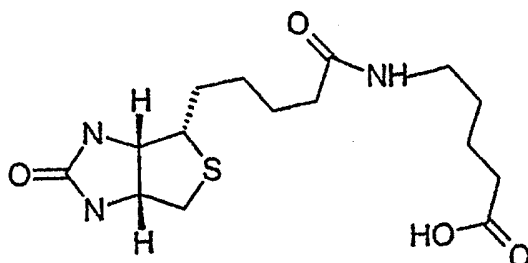
vysokých dávkách, aby se předešlo srážení krve a je nezbytné je neutralizovat na konci operace. Dále je výhodné mít k dispozici antitrombotická činidla, která se mohou neutralizovat z důvodu zastavení jejich antikoagulační aktivity v jakékoli chvíli. Je skutečností, že známé syntetické oligosacharidy popsané výše, se nemohou snadno neutralizovat známými protilátky pro heparin nebo LMWH, včetně protaminsulfátu.

Předkládaný vynález se týká nových syntetických polysacharidů se strukturou, která je podobná sloučeninám popsaným v patentových přihláškách číslo WO 98/03554 a WO 99/36443 a v patentu EP 529 715: stuktury syntetických oligosacharidů, které jsou předmětem podle předkládaného vynálezu, jsou modifikovány v tom smyslu, že obsahují kovalentní vazbu s biotinem (hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-pentanovou kyselinou) nebo s derivátem biotinu. Překvapivě se ukázalo, že zavedení biotinu nebo derivátu biotinu nemění farmakologickou aktivitu polysacharidů. Ve skutečnosti nové polysacharidy, které jsou předmětem podle předkládaného vynálezu, mají antitrombotickou aktivitu, která je srovnatelná s oligosacharidy podle dosa-
vadního stavu techniky. Mají však dále tu výhodu, že je možné je v případě potřeby rychle neutralizovat pomocí specifické protilátky. Touto specifickou protilátkou je avidin (The Merck Index, Dvanácté vydání, 1996, M.N. 920, strany 151-152) nebo streptavidin, což jsou dva tetramerní proteiny s odpovídajícími molárními hmotnostmi přibližně 66 000 a 60 000 Da, které mají velmi vysokou afinitu k biotinu.

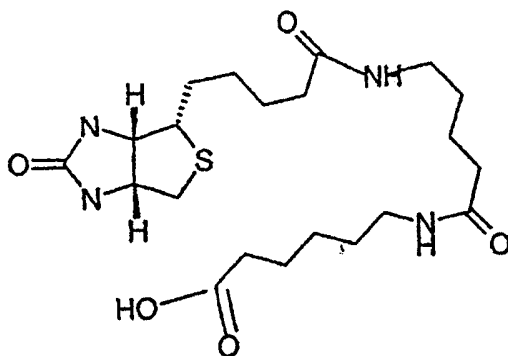
Podstata vynálezu

Obecně se předkládaný vynález týká syntetických polysacharidů s antitrombotickou aktivitou, které obsahují alespoň jednu kovalentní vazbu s biotinem nebo derivátem biotinu.

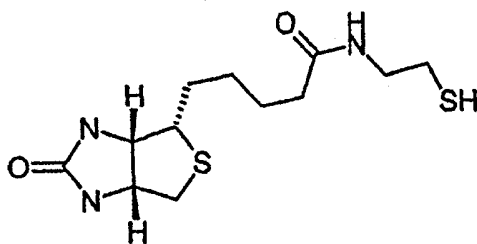
Je třeba poznamenat, že jako deriváty biotinu se mohou použít deriváty biotinu uvedené v katalogu Pierce, 1999-2000, strany 62 až 81, například 6-biotinamidohexanoát,



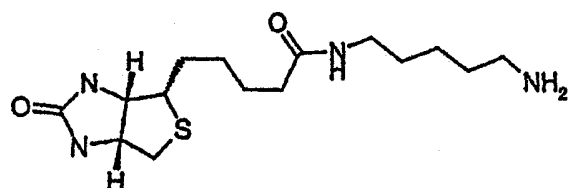
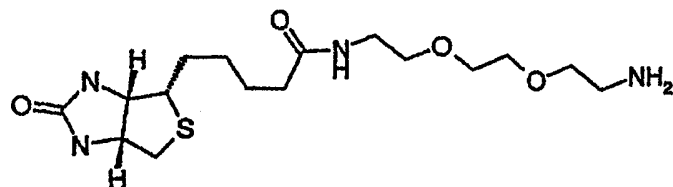
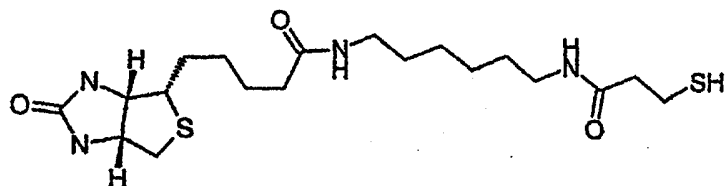
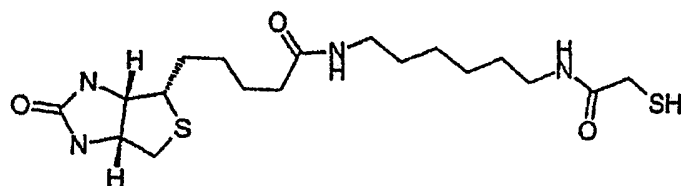
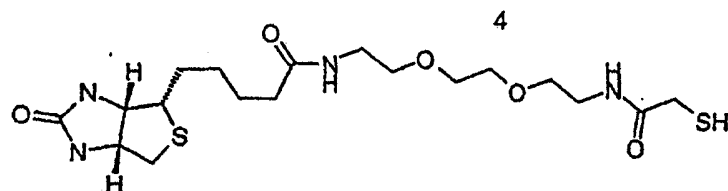
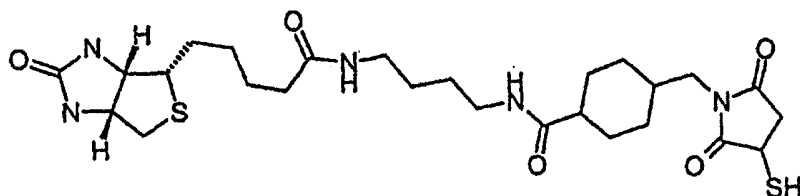
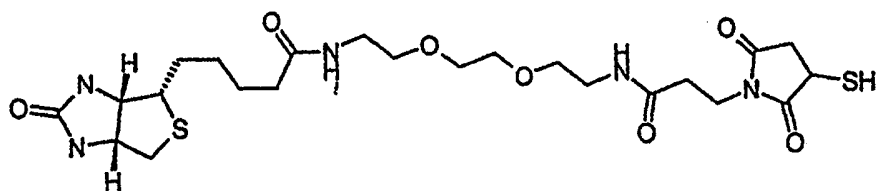
nebo 6-(6-biotinamidohexanamido)hexanoát,



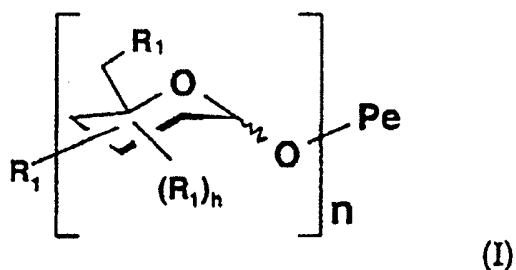
nebo 2-biotinamidoethanthiol



nebo sloučeniny následujících vzorců

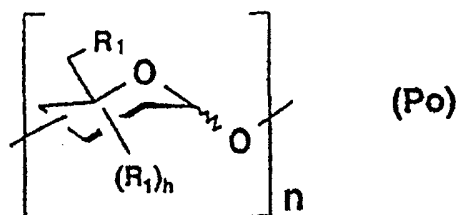


Předkládaný vynález se týká zejména polysacharidů obecného vzorce I:

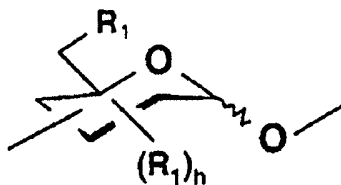


kde:

- kde vlnovka znamená vazbu umístěnou buď pod nebo nad rovinu pyranosového kruhu,



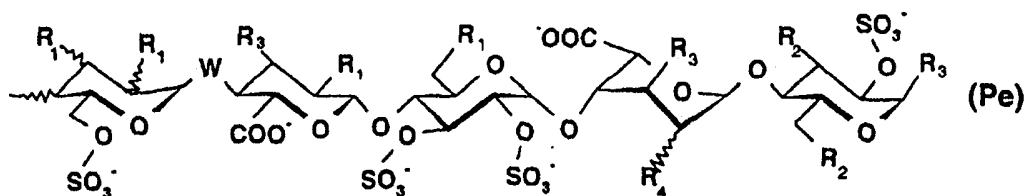
Po znamená polysacharid obsahující n stejných nebo různých monosacharidových jednotek vázaných prostřednictvím jejich anomerního atomu uhlíku k Pe,



což je schématické znázornění monosacharidové jednotky se strukturou pyranosy vybrané z hexos, pentos a odpovídajících deoxysacharidů, kdy tato jednotka je vázaná prostřednictvím anomerního atomu uhlíku k další monosacharidové jednotce a

hydroxylové skupiny této jednotky jsou substituované stejnými nebo různými skupinami R_1 , kde R_1 je definována dále,

- Pe je pentasacharid se strukturou:



- h je rovno 1 nebo 2,

- n je celé číslo a může nabývat hodnot 0 až 25,

- R_1 je můstek -T-Biot, alkoxykupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,

- R_2 je můstek -T-Biot, alkoxykupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,

- R_3 je můstek -T-Biot nebo alkoxykupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku,

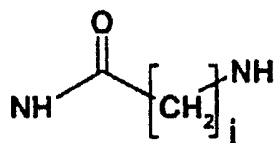
- R_4 je můstek -T-Biot, alkoxykupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$ nebo jinak R_4 tvoří můstek $-\text{O}-\text{CH}_2-$, kde skupina $-\text{CH}_2-$ je vázaná k atomu uhlíku nesoucímu karboxylovou funkční skupinu na stejném kruhu;

rozumí se, že nejméně jedna ze skupin R_1 , R_2 , R_3 nebo R_4 je skupina -T-Biot,

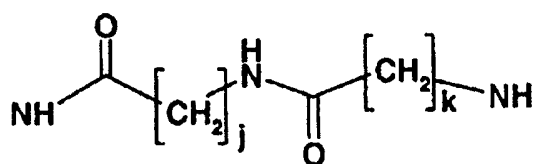
- W je atom kyslíku nebo methylenová skupina,

- T je můstek vybraný ze skupiny, kterou tvoří:

NH,

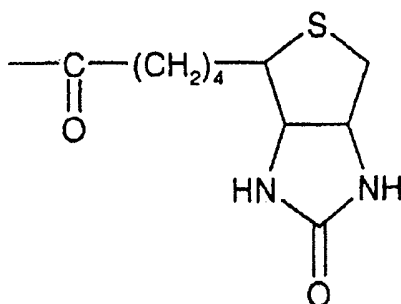


nebo



kde j a k , které jsou stejné nebo různé, jsou celá čísla, která mohou nabývat hodnot 1 až 10;

- Biot je skupina:



a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Jak bylo uvedeno výše, je třeba poznamenat, že obecně v popise podle předkládaného vynálezu znamená vlnovkovitá čára vazbu umístěnou buď pod nebo nad rovinu pyranosového kruhu.

Monosacharidy znázorněné v Po mohou být stejné nebo různé a interglykosidové vazby mohou být typu α nebo β .

Tyto monosacharidy jsou s výhodou vybrány z D nebo L hexos, alosy, altrosy, glukosy, mannosy, galosy, idosy, galaktosy

nebo talosy (v tomto případě $h = 2$) nebo z D nebo L pentos ribosy, arabinosy, xylosy nebo lyxosy (v tomto případě $h = 2$). Mohou se také použít další monosacharidy, jako jsou například deoxysacharidy ($h = 1$ a/nebo $-\text{CH}_2\text{R}_1 = \text{CH}_3$).

Polysacharidová část Po může obsahovat 0 až 25 alkylovaných a di- nebo trisulfatovaných monosacharidových jednotek.

Polysacharidová část Po může také obsahovat 0 až 25 alkylovaných a mono- nebo disulfatovaných monosacharidových jednotek.

Polysacharidová část Po může obsahovat 0 až 25 nenabitých a/nebo částečně nabitých a/nebo úplně nabitých alkylovaných monosacharidových jednotek.

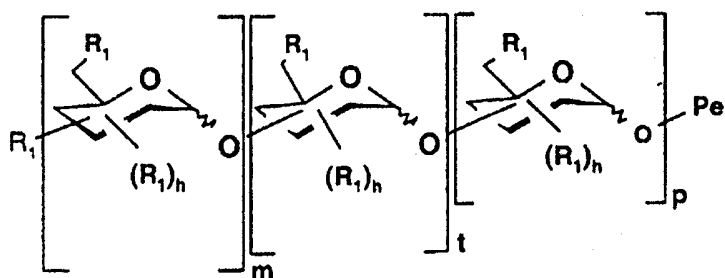
Nabité nebo nenabité jednotky mohou být rozptýleny podíl řetězce nebo mohou být seskupeny do nabitých nebo nenabitých sacharidových domén.

Vazby mezi jednotkami mohou být 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; a typu α nebo β .

V předkládaném popise byl výběr proveden tak, aby představoval konformaci ${}^1\text{C}_4$ pro L-iduronovou kyselinu a konformaci ${}^4\text{C}_1$ pro D-glukuronovou kyselinu, ale je dobře známo, že se obecně konformace v roztoku monosacharidů mění.

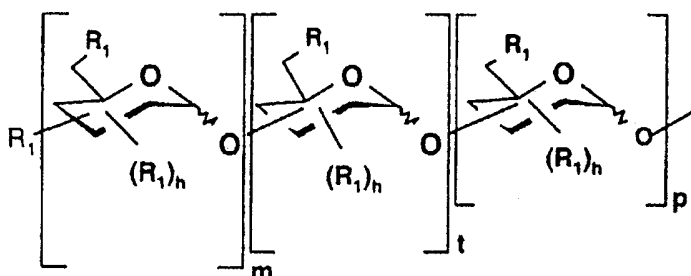
L-iduronová kyselina může mít tedy konformaci ${}^1\text{C}_4$, ${}^2\text{S}_0$ nebo ${}^4\text{C}_1$,

Podle jednoho aspektu se předkládaný vynález týká polysacharidů vzorce I.1:

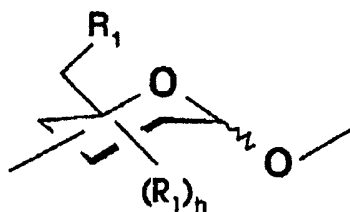


(I.1)

kde:



znamená konkrétní skupinu polysacharidů Po, které jsou vázány prostřednictvím svého anomerního atomu uhlíku k Pe jak je definováno pro sloučeniny vzorce I,



je stejná, jako je definováno pro sloučeniny vzorce I,

- skupiny R_1 jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I a u stejného monosacharidu mohou být stejné nebo různé,

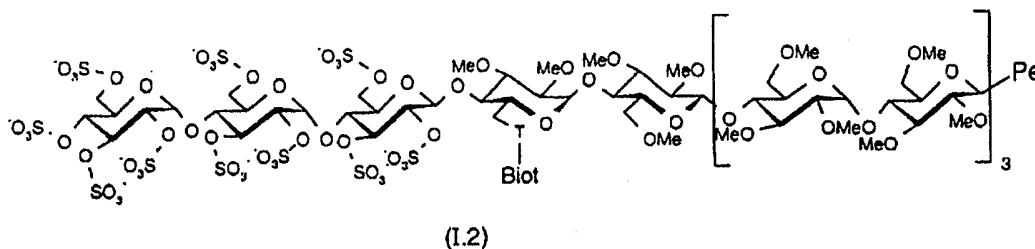
- monosacharid uvedený v $[\]_m$ se opakuje m-krát, monosacharid uvedený v $[\]_t$ se opakuje t-krát a monosacharid uvedený v $[\]_p$ se opakuje p-krát,

- m je celé číslo pohybující se mezi 1 až 5, t je celé číslo pohybující se mezi 0 až 24 a p je celé číslo pohybující se mezi 0 až 24, přičemž se rozumí, že $1 \leq m + t + p \leq 25$,

a jejich farmaceuticky přijatelných solí.

Mezi těmito polysacharidy vzorce I.1 tvoří polysacharidy, ve kterých pouze jedna ze skupin R_1 , R_2 , R_3 nebo R_4 je můstek T-Biot, kde T a Biot jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I, a jejich farmaceuticky přijatelné soli, další aspekt podle předkládaného vynálezu.

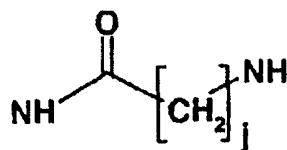
Podle zvláštního aspektu se předkládaný vynález týká hexadekasacharidů obecného vzorce I.2:



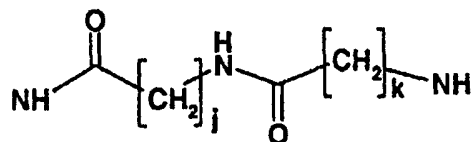
kde:

- T je můstek vybraný ze skupiny, kterou tvoří:

NH,

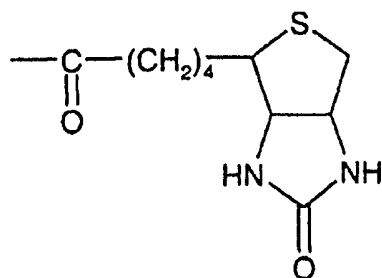


nebo

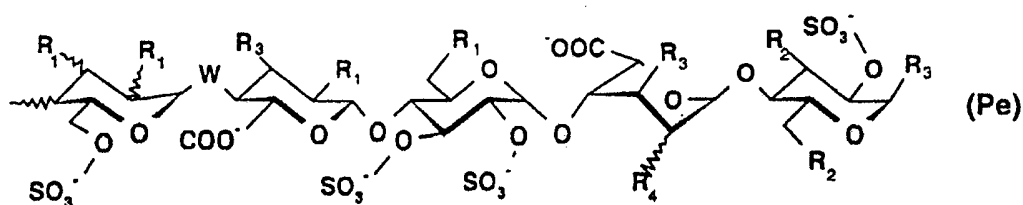


kde j a k , které jsou stejné nebo různé, jsou celá čísla pohybující se mezi 1 až 10;

- Biot je skupina



- Pe je pentasacharid struktury:



kde:

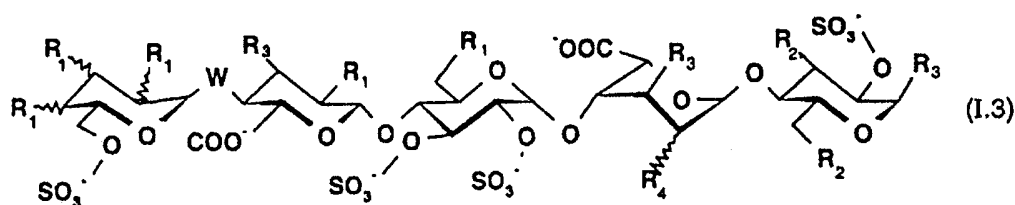
- R_1 je alkokyskupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,
- R_2 je alkokyskupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,
- R_3 je alkokyskupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku,

- R_4 je alkokyskupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$, nebo jinak R_4 tvoří můstek $-\text{O}-\text{CH}_2-$, kde skupina $-\text{CH}_2-$ je vázaná k atomu uhlíku nesoucímu karboxylovou funkční skupinu na stejném kruhu,

- W je atom kyslíku nebo methylenová skupina,

a jejich farmaceuticky přijatelných solí.

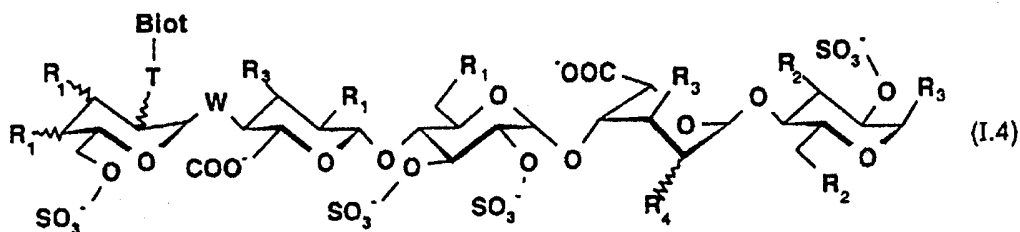
Podle dalšího aspektu se předkládaný vynález týká pentasacharidů obecného vzorce I.3:



kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 a W jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I a jejich farmaceuticky přijatelných solí.

Mezi těmito pentasacharidy vzorce I.3 tvoří pentasacharidy, ve kterých pouze jedna ze skupin R_1 , R_2 , R_3 nebo R_4 je můstek $-\text{T}-\text{Biot}$, kde T a Biot jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I, a jejich farmaceuticky přijatelné soli, další aspekt podle předkládaného vynálezu.

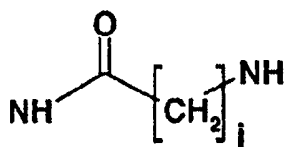
Mezi těmito pentasacharidy vzorce I.3 tvoří další předmět podle předkládaného vynálezu pentasacharidy obecného vzorce I.4:



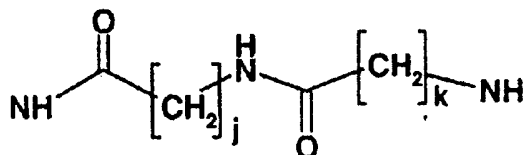
kde:

- T je můstek vybraný ze skupiny, kterou tvoří:

skupina NH,

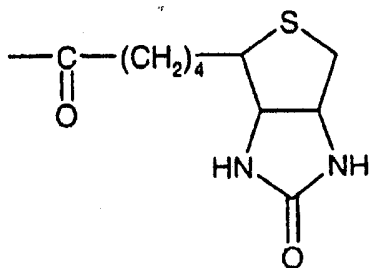


nebo



kde j a k, které jsou stejné nebo různé, jsou celá čísla, která mohou nabývat hodnot mezi 1 až 10;

- Biot je skupina:



- R₁ je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina -OSO₃⁻,

- R₂ je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina -OSO₃⁻,

- R₃ je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku,

- R_4 je alkokyskupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$, nebo jinak R_4 tvoří můstek $-\text{O}-\text{CH}_2-$, kde skupina $-\text{CH}_2-$ je vázaná k atomu uhlíku nesoucímu karboxylovou funkční skupinu na stejném kruhu,

- W je atom kyslíku nebo methylenová skupina,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Podle dalšího aspektu se předkládaný vynález týká následujících polysacharidů:

- sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-biotinamido-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamido)hexamido]-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopy-

ranosyluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl-α-L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(6-[6-(6-biotanamido)hexamido]hexamido]-6-deoxy-2,3-di-O-methyl-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)-[(2,3,6-tri-O-methyl-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl-β-D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl-α-L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2-biotinamido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl-β-D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl-α-L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2-[6-(6-biotinamidohexanoyl)]-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl-β-D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl-α-L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato-α-D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2-[6-(6-biotinamidohehexamido)hexamido]-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu.

Předkládaný vynález se týká polysacharidů v kyselé formě nebo ve formě jakékoli farmaceuticky přijatelné soli. V kyselé formě jsou skupiny -COO^- a -SO_3^- v tomto pořadí ve formě -COOH a $\text{-SO}_3\text{H}$.

Termínem "farmaceuticky přijatelná sůl polysacharidu podle předkládaného vynálezu" se rozumí polysacharid, ve kterém je jedna nebo více funkčních skupin -COO^- a/nebo -SO_3^- vázána iontově k farmaceuticky přijatelnému kationtu. Mezi výhodné soli sloučenin podle předkládaného vynálezu patří ty, jejich kation je vybrán z kationtů alkalických kovů a výhodněji ty, kde kationtem je Na^+ nebo K^+ .

Sloučeniny obecného vzorce I uvedeného výše také zahrnují sloučeniny, ve kterých je jeden nebo více atomů vodíku nebo atomů uhlíku nahrazen radioaktivním izotopem, například tritiem nebo uhlíkem-14, Tyto značené sloučeniny se používají ve výzkumu, při metabolických nebo farmakokinetických studiích a při biochemických testech jako ligandy.

Princip způsobu přípravy sloučenin podle předkládaného vynálezu spočívá v použití di- nebo oligosacharidových bází syntonů připravených podle postupů popsanych v literatuře. Je možné se odkázat zejména na patenty a patentové přihlášky EP 300 099, EP 529 715, EP 621 282 a EP 649 854 a dokumenty C. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32,

1671-1690, Tyto syntony se následně navzájem kondenzují za získání plně chráněných ekvivalentů polysacharidů podle předkládaného vynálezu. Tyto chráněné ekvivalenty se potom převedou na sloučeniny podle předkládaného vynálezu.

Jenda z báží syntonů uvedených výše obsahuje specificky chráněnou funkční skupinu umožňující následné zavedení biotinu nebo derivátu biotinu, například latentní amino funkční skupinu ve formě azidoskupiny nebo chráněnou ve formě N-ftalimid skupiny.

Při kondenzačních reakcích uvedených výše se "donor" di- nebo oligosacharidu aktivovaný na anomerním atomu uhlíku reaguje s "akceptorem" di- nebo oligosacharidu obsahujícím hydroxylovou skupinu.

Předkládaný vynález se týká způsobu přípravy sloučenin obecného vzorce I, který se vyznačuje tím, že: v prvním kroku se syntetizuje plně chráněný ekvivalet požadovaného polysacharidu I, obsahující chráněný prekursor domény Pe prodloužený na neredukujícím konci chráněným prekurzorem sulfatovaného polysacharidu Po, jeden z těchto prekurzorů obsahuje výhodně vhodně chráněnou amino funkční skupinu pro následné zavedení biotinu nebo derivátu biotinu; v druhém kroku se zavedou a/nebo ochrání záporně nabitě skupiny; ve třetím kroku se odstraní chránící skupina z minoskupiny a potom se zavede biotin nebo derivát biotinu.

Syntéza Pe se provádí pomocí způsobů popsaných zejména v patentových přihláškách WO 98/03554 a WO 99/36443 a v literatuře citované výše.

Polysacharidová část, která je prekurzorem Po se syntetizuje pomocí reakcí, které jsou odborníkům v této oblasti známé, za

použití způsobů syntézy oligosacharidů (G.J. Boons, *Tetrahedron*, 1996, 52, 1095-1121, WO 98/03554 a WO 99/36443) nebo se oligosacharid, pokud oligosacharid, který je donorem glykosidické vazby, kondenzuje s oligosacharidem, který je akceptorem glykosidické vazby, za vzniku jiného oligosacharidu, jehož velikost je rovna součtu velikostí obou reakčních partnerů. Tento postup se opakuje, dokud se nezíská požadovaná sloučenina vzorce I. Povahu a profil náboje finální požadované sloučeniny určuje povaha chemických entit použitých v různých stupních syntézy podle pravidel, která jsou odborníkům v této oblasti známá. Jako odpazy je možné uvést například C. van Boeckel a M. Petitou, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1671-1690, nebo H. Paulsen, "Advances in selective chemical syntheses of complex oligosaccharides", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 21, 155-173 (1982).

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se získají ze svých plně chráněných polysacharidových prekurzorů za použití následující série reakcí:

- alkoholové funkční skupiny, které se mají převést na O-sulfoskulinu a karboxylovou skupinu, se zbaví chránících skupin použitých při přípravě hlavního řetězce (páteře), potom
- se následně zavedou sulfoskupiny,
- odstraní se chránící skupiny z amino funkčních skupin, což umožní zavedení biotinu nebo derivátu biotinu,
- pomocí obvyklých kondenzačních reakcí amin/kyselina se zavede biotin nebo derivát biotinu.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou samozřejmě připravit za použití různých strategií, které jsou odborníkům v této oblasti známe pro syntézu oligosacharidů.

Způsob popsany výše je výhodným způsobem. Sloučeniny obecného vzorce I se však mohou připravit pomocí jiných způsobů, které jsou dobře známe v oblasti chemie cukrů, popsanych například v publikaci *Monosaccharides, their chemistry and their roles in natural products*, P.M. Collins a R.J. Ferrier, J. Wiley & Sons, 1995, a v G.J. Boons, *Tetrahedron*, 1996, 52, 1095-1121,

Pentasacharidy Pe se mohou tedy získat z disacharidových syntonů způsobem popsaným v publikaci C. van Boeckel a M. Petitou, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1671-1690,

Chránícími skupinami použitými při způsobu přípravy sloučenin obecného vzorce I jsou takové skupiny, které se běžně používají v chemii cukrů, například ty, které jsou popsány v *Protective Groups in Organic Synthesis*, T.W. Greene, John Wiley & Sons, New York, 1981,

Chránící skupiny jsou s výhodou vybrány ze skupiny, kterou tvoří acetylová skupina, halogenmethylová skupina, benzoylová skupina, levulinylová skupina, benzylová skupina, substituovaná benzylová skupina, popřípadě substituovaná tritylová skupina, tetrahydropyranylová skupina, allylová skupina, pentenylová skupina, terc-butyldimethylsilylová skupina (tBDMS) nebo trimethylsilylethylová skupina.

Aktivačními skupinami jsou skupiny, které se běžně používají v chemii cukrů a jsou popsány například v G.J. Boons, *Tetrahedron*, 1996, 52, 1095-1121. Tyto aktivační skupiny jsou například vybrány ze skupiny, kterou tvoří imidáty, thioglykosidy, pentenylglykosidy, xantáty, fosfity nebo halogenidy.

Pokud jde o způsob, kterým se váže biotin k oligosacharidu a povahu derivátu biotinu, chemická literatura nabízí různé možnosti, které mohou využívat sady chránících skupin, které jsou

odborníkům v této oblasti dobře známé. S výhodou se použijí amino funkční skupiny, thiolové funkční skupiny nebo karboxylové funkční skupiny nebo aldehydické funkční skupiny, které se budou reagovat s derivátem biotinu obsahujícím reaktivní skupinu typu aktivovaného esteru, maleimidu, jodacetylové nebo primární aminoskupiny, přičemž se reakce provádí podle podmínek popsanych v literatuře (například Savage a kol., *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*; Pierce Chemical Company, 1992).

Způsob popsany výše umožňuje získat sloučeniny podle předkládaného vynálezu ve formě solí. Za účelem získání odpovídajících kyselin se sloučeniny podle předkládaného vynálezu ve formě solí uvedou do styku s kationtově výměnnou pryskyřicí ve formě kyseliny.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu ve formě kyselin se mohou následně neutralizovat pomocí báze za získání požadované soli. Pro přípravu solí sloučenin obecného vzorce I se mohou použít jakékoli anorganické nebo organické báze, které poskytují farmaceuticky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce I. Jako báze se s výhodou použijí hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid vápenatý nebo hydroxid hořečnatý. Výhodnými solemi jsou sodné a vápenaté soli sloučenin obecného vzorce I.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu byly podrobeny biochemickým a farmakologickým testům.

Celková antitrombotická aktivita těchto látek a jejich neutralizace byly studovány na modelu žilní trombózy zahrnujícím injekci tkáňového faktoru, po které následovalo městnání krve v duté žíle krys podle postupu popsaneho v J.-M. Herbert a kol., *Blood*, 1998, 91, 4197-4205, Na tomto modelu se dosáhlo 60% inhibice trombózy po nitrožilní injekci 0,1 až 30 mmol/kg

sloučenin. Injekce avidinu v molárním poměru 1 ku 1 000 výborně snížila antitrombotický účinek těchto sloučenin, kdy bylo možné dosáhnout snížení většího, než 50 %. Stejným způsobem se neutralizovala prohemoragická aktivita sloučenin prostřednictvím injekce avidinu ve výše uvedených dávkách. Také oběhová aktivita oligosacharidů, měřená prostřednictvím anti-Xa aktivity a/nebo anti-IIa aktivity, se neutralizuje pomocí injekce avidinu.

Dalším aspektem podle předkládaného vynálezu je tedy způsob použití avidinu nebo streptavidinu, který se vyznačuje tím, že umožňuje neutralizovat polysacharidy podle předkládaného vynálezu. Avidin nebo streptavidin se mohou použít pro přípravu léčiv určených pro neutralizaci polysacharidů podle předkládaného vynálezu.

Pro svou biochemickou a farmaceutickou aktivitu jsou oligosacharidy podle předkládaného vynálezu velice výhodnými léčivy. Jejich toxicita je zcela slučitelná s jejich použitím. Jsou také velmi stabilní a proto jsou velice vhodné pro to, aby tvořily aktivní složku patentovaných farmaceutických produktů.

Mohou se použít při různých onemocněních vznikajících jako důsledek modifikace homeostázy systému srážení krve vyskytující se zejména při onemocněních kardiovaskulárního nebo cerebrovaskulárního systému, jako jsou tromboembolická onemocnění související s atherosklerózou a diabetem, například nestabilní angina, apoplexie, restenóza po angioplastice, endarterektómie nebo vložení endovaskulární protézy; nebo tromboembolická onemocnění související s retrombózou po trombolýze, s infarktem, s demencí ischemického původu, s onemocněními periferních arterií, s hemodialýzou nebo s aurikulární fibrilací, nebo při použití cévních protéz při aortokoronárním bypassu. Dále se

mohou tyto sloučeniny použít pro léčení nebo prevenci tromboembolických onemocnění žilního původu, jako je plicní embolie. Mohou se použít při léčení nebo prevenci trombotických komplikací pozorovaných například po chirurgických operacích, růstu nádorů nebo poruchách koagulace vyvolaných bakteriemi, virovými nebo enzymatickými aktivátory. V případě jejich použití při vkládání protéz mohou sloučeniny podle předkládaného vynálezu pokrýt protézy a tak dosáhnout jejich hemokompatibility. Mohou se zejména takto nanést na intravaskulární protézy (stenty). V tomto případě se mohou popřípadě chemicky modifikovat zavedením vhodného ramene na neredukující nebo redukující konec, jak je popsáno například v EP 649 854.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou také použít jako adjuvanty při enarterektomii prováděné pomocí porézních balónů.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou použít při přípravě léčiv určených pro léčbu výše uvedených onemocnění.

Podle dalších aspektů je předmětem podle předkládaného vynálezu farmaceutická kompozice obsahující jako aktivní látku syntetický polysacharid podle předkládaného vynálezu nebo jednu z jeho farmaceuticky přijatelných solí, popřípadě v kombinaci s jednou nebo více inertními a vhodnými přísadami.

Jmenované přísady se vyberou podle požadované farmaceutické formy a požadovaného způsobu podávání: orální, podjazykové, subkutánní, intramuskulární, nitrožilní, transdermální, transmukosální, místní nebo rektální.

Aktivní složka může být také přítomna ve formě komplexu s cyklodextriny, například α -, β - nebo γ -cyklodextrinem, 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem nebo methyl- β -cyklodextrinem.

Aktivní složka se může také uvolňovat pomocí balónku obsahujícího tuto látku nebo pomocí endovaskulárního expandéru zavedeného do cévy. Farmakologická účinnost aktivní látky tím zůstává nezměněna.

V každé jednotkové dávce je aktivní složka přítomna v množstvích vhodných pro dosažení předpokládané denní dávky, která poskytne požadovaný profylaktický nebo terapeutický účinek. každá dávkovací jednotka může obsahovat 0,1 až 100 mg aktivní látky, s výhodou 0,5 až 50 mg aktivní látky. Tyto dávky anti-koagulační sloučeniny se mohou neutralizovat dávkami avidinu nebo streptavidinu pohybujícími se mezi 1 až 1000 mg při iv (nitrožilním) injekci, bolu nebo infuzi.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou také použít v kombinaci s jednou nebo více jinými aktivními látkami vhodnými pro použití při požadované léčbě, jako jsou například antitrombotika, antikoagulanty, inhibitory srážení krevních destiček, jako jsou například dipyridamole, aspirin, ticlopidin nebo clopidogrel, nebo antagonisté komplexu glykoprotein IIb/IIIa.

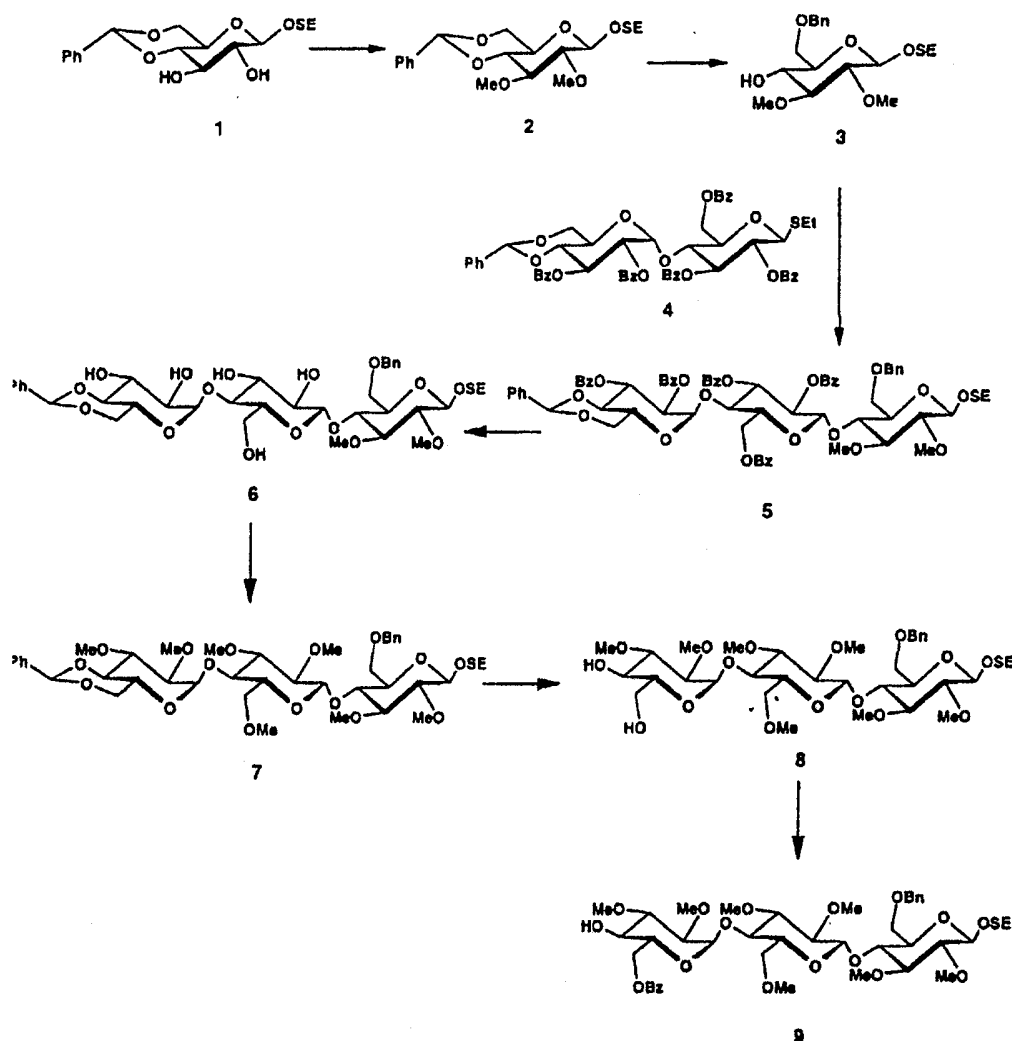
Následující způsoby, přípravy a schémata ilustrují syntézy různých meziproduktů pro použití při přípravě polysacharidů podle předkládaného vynálezu.

Používají se následující zkratky: Bn: benzylová skupina; Bz: benzoylová skupina; TLC: chromatografie na tenké vrstvě; Ts: tosylová skupina; Lev: levulinylová skupina; Et: ethylová skupina; Ph: fenylová skupina; Me: methylová skupina; Ac: acetylová skupina; SE: trimethylsilylethylová skupina; ESI: ionizace pomocí elektronspreje; Biotin: hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-pentanová kyselina; Z: benzyloxykarbonylová skupina.

Následující příklady syntézy sloučenin podle předkládaného vynálezu jsou podrobně popsány za účelem ilustrace a v žádném ohledu neomezují rozsah podle předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Schéma 1 - syntéza trisacharidu 9



Příprava 1

2-(Trimethylsilyl)ethyl-4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (2)

18 g hydridu sodného se při 0 °C po částech přidá k roztoku 15,8 g (42,8 mmol) sloučeniny 1 (připravené podle postupu popsaného v K. Jansson a kol., *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 5629-5647) a 20 ml (319 mmol) methyljodidu v 350 ml tetrahydrofuranu. Reakční směs se míchá 4 hodiny při teplotě místnosti. Přebytek hydridu sodného se rozloží methanolem a reakční směs se nalije do 1,5 l ledově studené vody. Po extrakci ethylacetátem se organická fáze promyje nasyceným roztokem chloridu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným a potom se odpaří ve vakuu. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí 15/1 (objemově) cyklohexan/ethylacetát a získá se 16,8 g sloučeniny 2.

$[\alpha]_D = -41^\circ$ ($c = 0,69$, dichlormethan).

Příprava 2

2-(Trimethylsilyl)ethyl-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (3)

82 g 3Å molekulových sít, methyloranž jako barevný indikátor, 34 g (526 mmol) kyanoborohydridu sodného se postupně přidá k 16 g (40,3 mmol) roztoku sloučeniny 2 v 600 ml tetrahydrofuranu a potom se přikapává nasycený roztok chlorovodíku v diethyletheru dokud se nedosáhne růžového zbarvení. Po filtraci a extrakci ethylacetátem se organická fáze promyje nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, suší se nad síranem sodným a potom se odpaří ve vakuu. Po chromatografii na koloně silikagelu za eluce směsí 3/1 (objemově) toluen/ethylacetát se získá 12,5 g sloučeniny 3.

$[\alpha]_D = -42^\circ$ ($c = 1,2$, dichlormethan).

Příprava 3

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-benzoyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (5)

Směs 16,52 g (16,60 mmol) thioglykosidu 4 (získaného podle přípravy 1 popsané v Mezinárodní patentové přihlášce WO 99/36443), 6,0 g (15,05 mmol) sloučeniny 3 a 16,7 g 4Å práškových molekulových sít v 300 ml toluenu se 1 hodinu míchá v atmosféře argonu. Směs se potom ochladí na -20 °C. K reakční směsi se přikape roztok 3,9 g (17,4 mmol) N-jodsukcinimidu a 0,17 ml (1,97 mmol) trifluormethansulfonové kyseliny v 86 ml směsi 1/1 (objemově) dichlormethan/dioxan. Po 10 minutách se reakční směs filtruje, zředí se dichlormethanem, postupně se promyje 1M roztokem thiosíranu sodného, 10% roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným a odpaří se ve vakuu. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí 6/1 (objemově) toluen/ethylacetát a získá se 18,8 g trisacharidu 5.

$[\alpha]_D = +34^\circ$ ($c = 1,26$, dichlormethan).

Příprava 4

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (6)

3,15 g terc-butoxidu draselného se přidá k roztoku 18,7 g (14 mmol) sloučeniny 5 v 140 ml směsi 1/1 (objemově) methanol/dioxan. Reakční směs se míchá 2 hodiny při teplotě místnosti. Neutralizuje se na pryskyřici Dowex® 50WX4 H⁺, filtruje se a odpaří se ve vakuu. Zbytek se čistí pomocí kolonové chromato-

grafie na silikagelu za eluce směsí 20/1 (objemově) dichlor-methan/methanol a získá se 10,0 g sloučeniny 6.

$[\alpha]_D = +29^\circ$ ($c = 1,11$, dichlormethan).

Příprava 5

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (7)

5,2 g (216 mmol) hydridu sodného se po částech v atmosféře argonu přidá k ochlazené (0 °C) směsi 9,93 g (12,24 mmol) sloučeniny 6 a 9,0 ml (138 mmol) methyljodidu ve 100 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Směs se míchá 20 hodin při teplotě místnosti. Přebytek hydridu sodného se rozloží methanolem a reakční směs se nalije do 500 ml ledově studené vody. Po extrakci ethylacetátem se organická fáze promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, suší se nad síranem sodným a potom se odpaří ve vakuu a získá se 11 g sloučeniny 7, která se použije v následujícím kroku bez dalšího čištění.

TLC: $R_f = 0,38$, silikagel, 3/2 (objemově) toluen/ethylacetát.

Příprava 6

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (8)

11 g sloučeniny 7 se rozpustí v 180 ml 60% kyseliny octové a míchá 1,5 hodiny při 80 °C. Směs se odpaří a potom se ještě jednou odpaří společně s toluenem. Zbytek se čistí pomocí

kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 2/1 (objemově) toluen/aceton a získá se 8,46 g sloučeniny 8.

TLC: $R_f = 0,36$, silikagel, 1/1 (objemově) toluen/aceton.

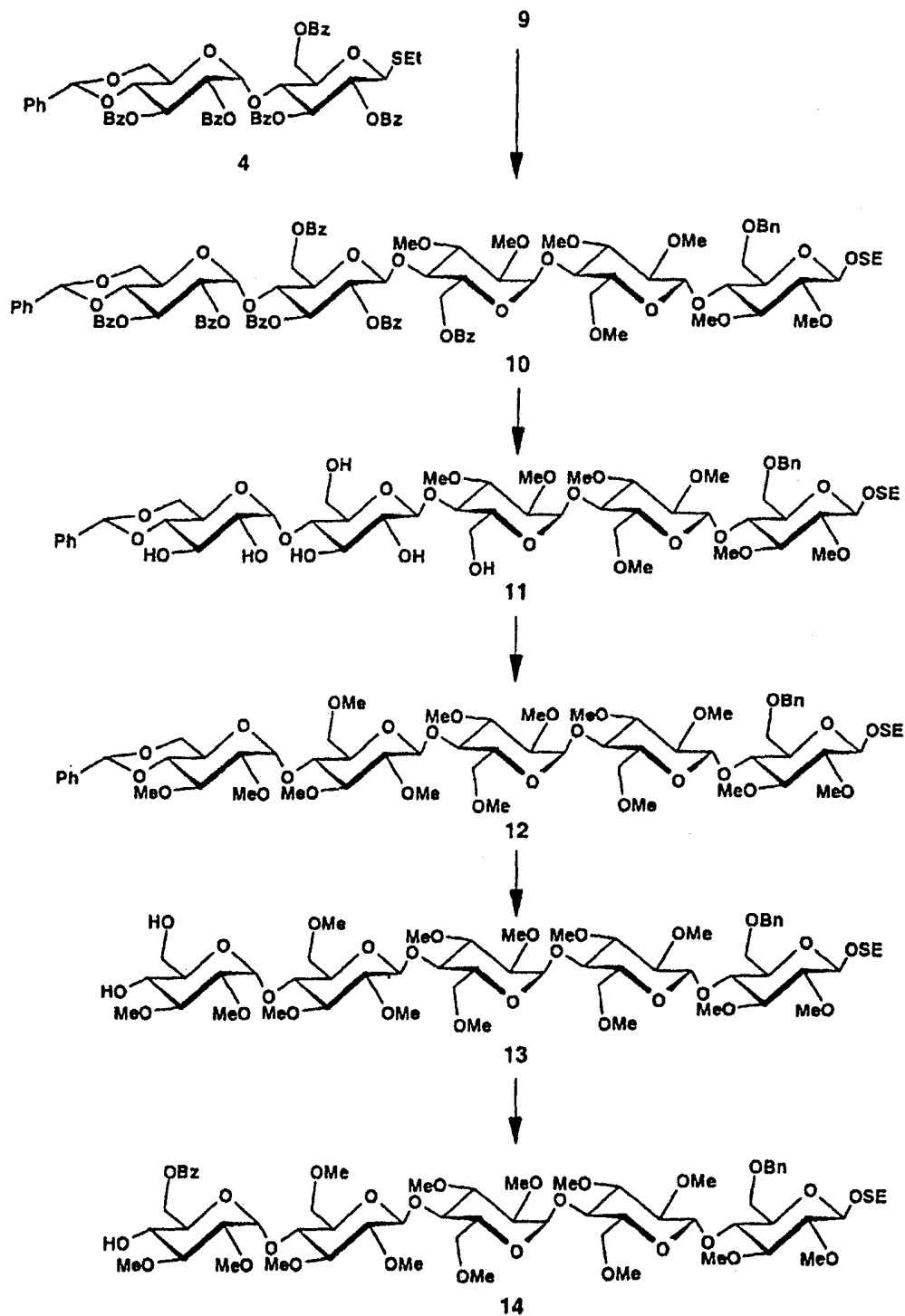
Příprava 7

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(6-O-benzoyl-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (9)

5,36 g (22,4 mmol) 1-Benzoyloxy-1H-benzotriazolu a 3,32 ml triethylaminu se přidá k roztoku 8,41 g (10,6 mmol) sloučeniny 8 v 110 ml dichlormethanu. Směs se míchá 20 minut při teplotě místnosti a potom se zředí dichlormethanem, promyje se nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným a potom se odpaří ve vakuu. Zbytek se čistí pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 5/0,5/0,25 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol a získá se 8,40 g sloučeniny 9.

$[\alpha]_D = +15^\circ$ ($c = 2$, dichlormethan).

Schéma 2 - Syntéza peatasacharidu 14



Příprava 8

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-benzoyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-O-benzoyl-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (10)

Sloučenina 9 se převede na sloučeninu 10 podle postupu popsaného v přípravě 3.

$[\alpha]_D = +42^\circ$ (c = 2, dichlormethan).

Příprava 9

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (11)

Sloučenina 10 se převede na sloučeninu 11 podle postupu popsaného v přípravě 4.

TLC: $R_f = 0,35$, silikagel, 10/1 (objemově) dichlormethan/methanol.

Příprava 10

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (12)

Sloučenina 11 se převede na sloučeninu 12 podle postupu popsaného v přípravě 5.

TLC: $R_f = 0,11$, silikagel, 1/2 (objemově) cyklohexan/ethylacetát.

Příprava 11

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (13)

Sloučenina 12 se převede na sloučeninu 13 podle postupu popsaného v přípravě 6.

TLC: $R_f = 0,33$, silikagel, 2/0,5/0,5 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol.

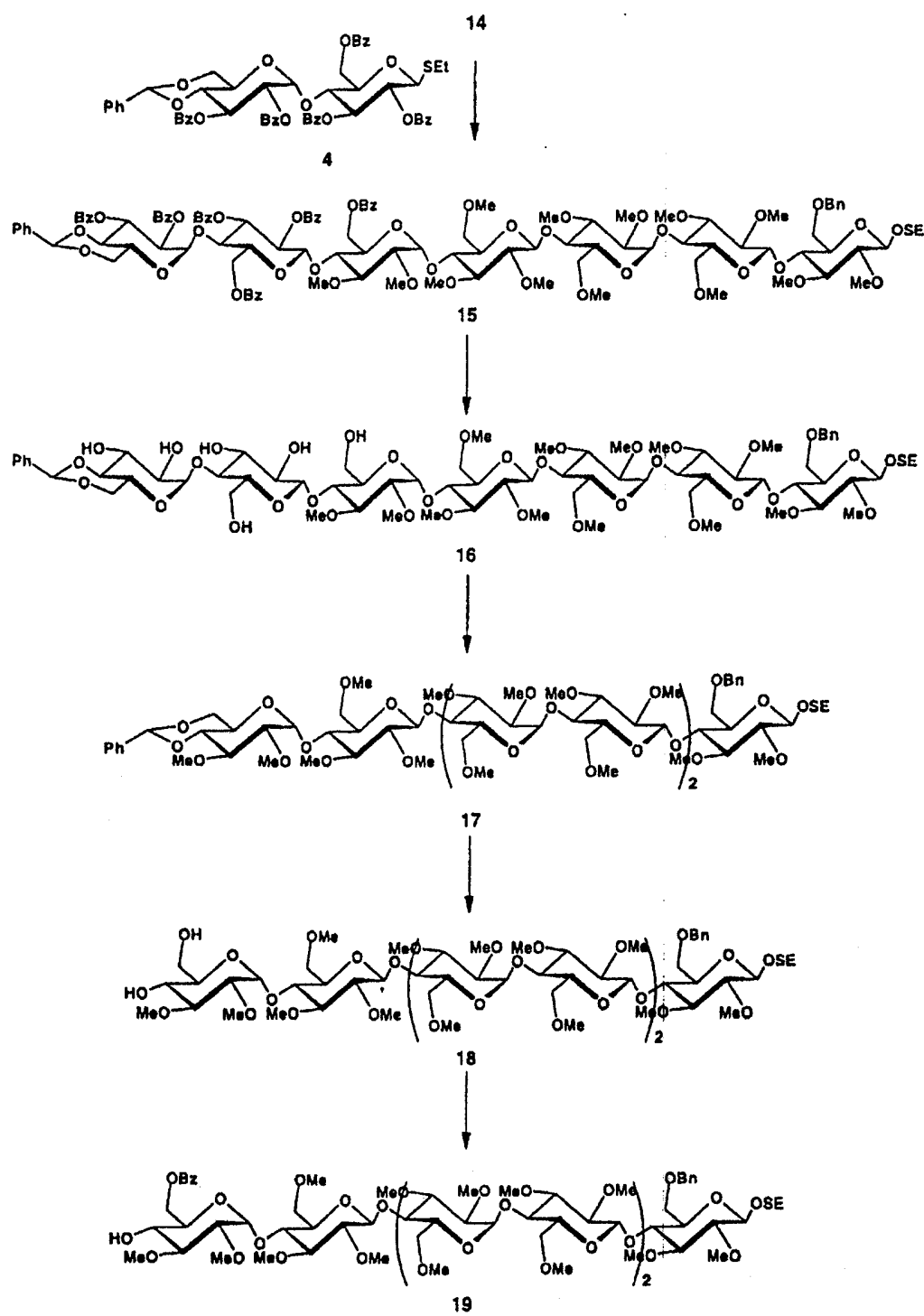
Příprava 12

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(6-O-benzoyl-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (14)

Sloučenina 13 se převede na sloučeninu 14 podle postupu popsaného v přípravě 7.

TLC: $R_f = 0,16$, silikagel, 3/0,5/0,5 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol.

Schéma 3 - Synthéza heptasacharidu 19



Příprava 13

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-benzoyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-O-benzoyl-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (15)

Kondenzační reakce sloučeniny 14 s disacharidem 4 se provede podle postupu popsaného v přípravě 3 a získá se sloučenina 15.

$[\alpha]_D = +52^\circ$ (c = 1,1, dichlormethan).

Příprava 14

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (16)

Sloučenina 15 se převede na sloučeninu 16 podle postupu popsaného v přípravě 4.

TLC: $R_f = 0,31$, silikagel, 10/1 (objemově) dichlormethan/methanol.

Příprava 15

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-

$(1 \rightarrow 4) - [(2,3,6\text{-tri-O-methyl-}\alpha\text{-D-glukopyranosyl}) - (1 \rightarrow 4) - (2,3,6\text{-tri-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosyl}) - (1 \rightarrow 4)]_2\text{-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosid}$ (17)

Sloučenina 16 se převede na sloučeninu 17 podle postupu popsaného v přípravě 5.

TLC: $R_f = 0,46$, silikagel, 10/1 (objemově) dichlormethan/methanol.

Příprava 16

$2\text{-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-methyl-}\alpha\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\alpha\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\alpha\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosid}$ (18)

Sloučenina 17 se převede na sloučeninu 18 podle postupu popsaného v přípravě 6.

TLC: $R_f = 0,42$, silikagel, 1/0,5/0,5 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol.

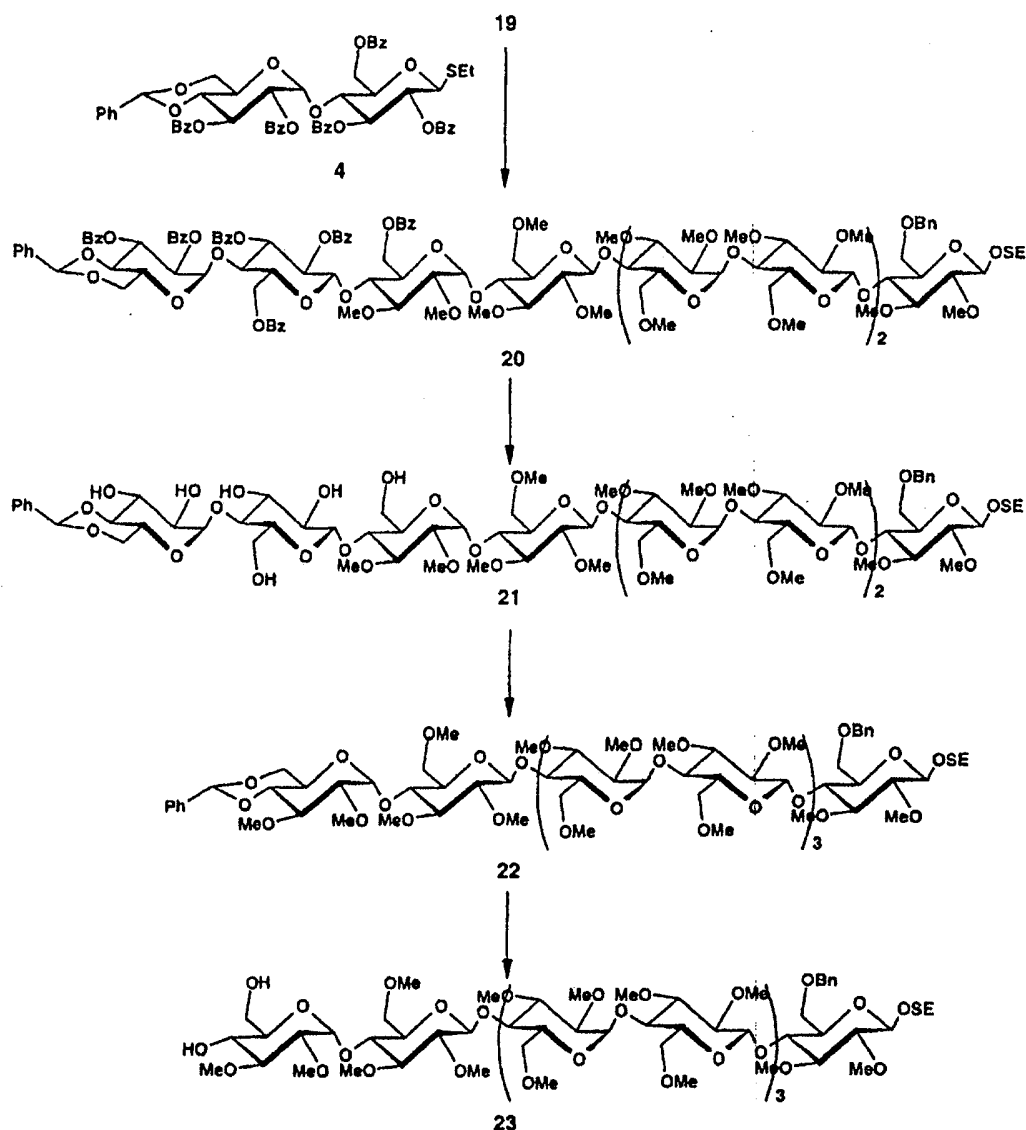
Příprava 17

$2\text{-(Trimethylsilyl)ethyl-(6-O-benzoyl-2,3-di-O-methyl-}\alpha\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\alpha\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\alpha\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-(2,3,6-tri-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosyl)-(1}\rightarrow\text{4)-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl-}\beta\text{-D-glukopyranosid}$ (19)

Sloučenina 18 se převede na sloučeninu 19 podle postupu popsaného v přípravě 7.

TLC: $R_f = 0,25$, silikagel, 3/0,5/0,5 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol.

Schéma 4 - Syntéza nonasacharidu 23



Příprava 18

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-benzoyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-O-benzoyl-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₂-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (20)

Směs 5,2 g (5,23 mmol) thioglykosidu 4, 4,72 g (2,75 mmol) heptasacharidu 19 a 4Å práškových molekulových sít v toluenu se míchá 1 hodinu v atmosféře argonu. Potom se při 0 °C přikape roztok 1,36 g (5,85 mmol) N-jodsukcinimidu a 0,140 ml (1,56 mmol) trifluormethansulfonové kyseliny v 32 ml směsi 1/1 (objemově) dichlormethan/dioxan. Po 15 minutách se reakční směs filtruje, postupně se promyje 1M roztokem thiosíranu sodného, 10% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným a odpaří se ve vakuu. Zbytek se čistí pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 3/0,5/0,5 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol a získá se 7,13 g sloučeniny 20.

$[\alpha]_D = +65^\circ$ (c = 1,4, dichlormethan).

Příprava 19

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-

tri-O-methyl-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)]₂-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl-β-D-glukopyranosid (21)

Sloučenina 20 se převede na sloučeninu 21 podle postupu popsaného v přípravě 4.

TLC: $R_f = 0,27$, silikagel, 10/1 (objemově) dichlormethan/methanol.

Příprava 20

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-methyl-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)]₃-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl-β-D-glukopyranosid (22)

Sloučenina 21 se převede na sloučeninu 22 podle postupu popsaného v přípravě 5.

TLC: $R_f = 0,31$, silikagel, 5/1/1 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol.

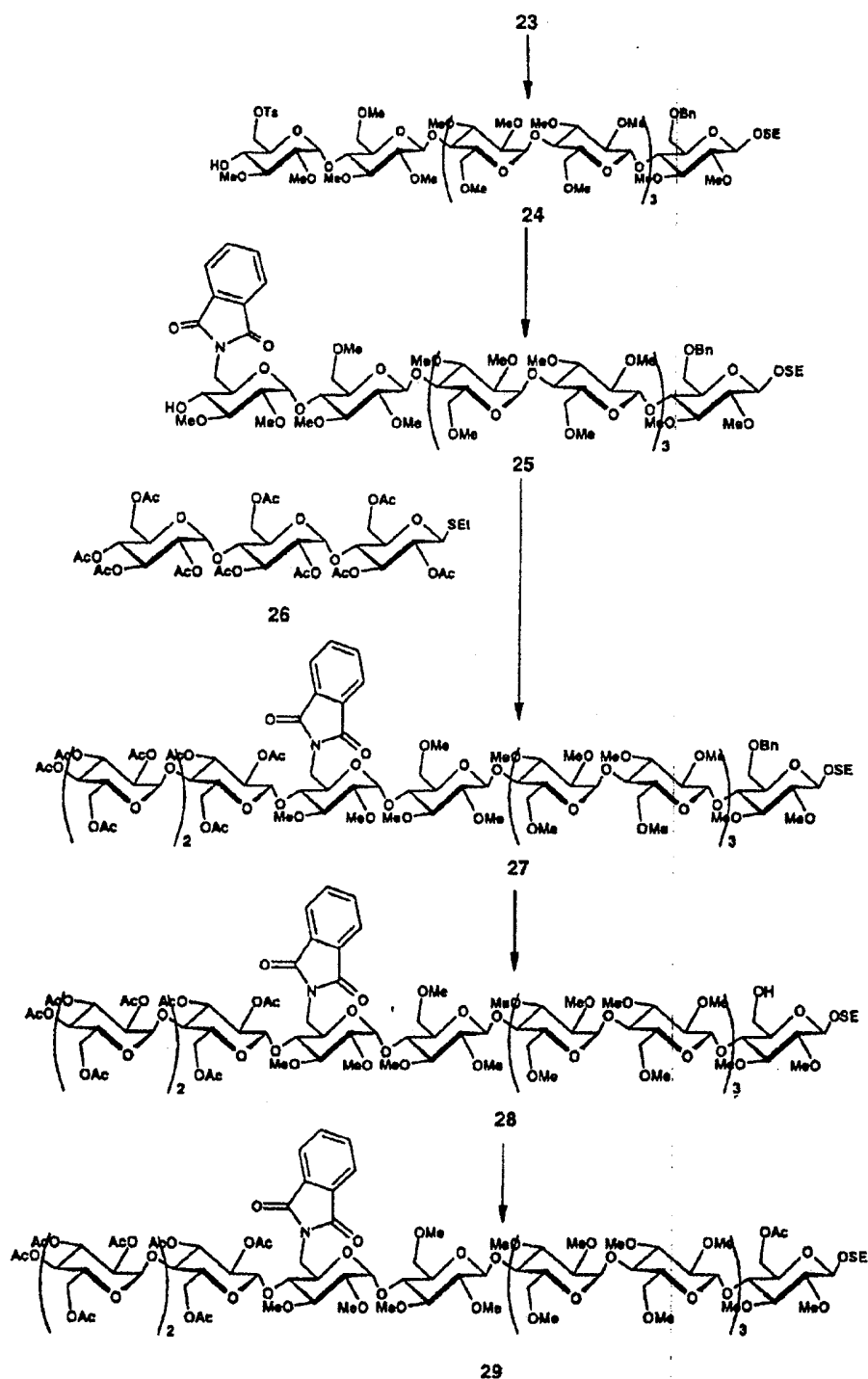
Příprava 21

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-methyl-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)-[(2,3,6-tri-O-methyl-α-D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl-β-D-glukopyranosyl)-(1→4)]₃-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl-β-D-glukopyranosid (23)

Sloučenina 22 se převede na sloučeninu 23 podle postupu popsaného v přípravě 5.

TLC: $R_f = 0,35$, silikagel, 2/1/1 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol.

Schéma 5 - Syntéza nonasacharidu 29



Příprava 22

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3-di-O-methyl-6-O-tosyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (24)

1,09 g sloučeniny 23 se v atmosféře argonu rozpustí v 10 ml pyridinu a potom se přidá 1,03 g tosylchloridu. Po 2 hodinách míchání se reakční směs zředí 100 ml dichlormethanu. Organická fáze se postupně promyje 10% roztokem hydrogensíranu draselného a potom vodou, suší se a odpaří do sucha. Po kolonové chromatografii na silikagelu za eluce směsí 2,3/2 (objemově) toluen/aceton se získá 1,77 g sloučeniny 24.

TLC: R_f = 0,5, silikagel, 3/1/1 (objemově) cyklohexan/ethylacetát/ethanol.

Příprava 23

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (25)

225 mg (1,38 mmol) Ftalimidu draselného a potom 121,5 mg (0,46 mmol) crownetheru 18-crown-6 se přidá k roztoku 500 mg (0,23 mmol) sloučeniny 24 v 11 ml N,N-dimethylformamidu obsahujícím 4Å prášková molekulární síta. Směs se míchá 4 hodiny při 80 °C. Po ochlazení se reakční směs zředí dichlormethanem, filtruje se přes křemelinu a odpaří se. Zbytek se čistí pomocí

chromatografie na gelu Sephadex® LH20 (3 x 100 cm) (1/1 (objemově) dichlormethan/ethanol), potom pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 11/2 (objemově) toluen/ethanol a získá se 417,4 mg sloučeniny 25.

TLC: $R_f = 0,38$, silikagel, 11/2 (objemově) toluen/ethanol.

Příprava 24

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1→4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1→4)]₃-6-O-benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (27)

Směs 1,515 g (1,564 mmol) thioglykosidu 26 (připraveného podle postupu pro přípravu sloučeniny 41, přípravy 36, patentové přihlášky WO 99/36443), 840 mg (0,391 mmol) akceptoru 25 a 2,15 g 4Å molekulových sít v 33 ml toluenu se míchá 1 hodinu v atmosféře argonu. Reakční směs se ochladí na 0 °C a přidá se roztok 385 mg N-jodsukcinimidu a 55,4 μ l trifluormethansulfonové kyseliny v 7 ml směsi 1/1 (objemově) dichlormethan/dioxan. Po 10 minutách se směs filtruje, zředí se toluenem, postupně se promyje 1M roztokem thiosíranu sodného, 10% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným a potom se odpaří ve vakuu. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na gelu Sephadex® LH20 (1/1 (objemově) dichlormethan/ethanol), potom pomocí kolonové chromatografie na silikagelu (5/4 (objemově) toluen/acetone), a získá se 887 mg sloučeniny 27.

$[\alpha]_D = +70^\circ$ ($c = 0,35$, dichlormethan).

Příprava 25

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (28)

Roztok 750 mg (0,245 mmol) sloučeniny 27 v 37 ml kyseliny octové se hydrogenuje při tlaku 500 kPa v přítomnosti 750 mg 10% palladia na uhlí 2,5 hodiny. Po filtraci se roztok odpaří a zbytek se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí 6/1 (objemově) toluen/ethanol a získá se 728 mg sloučeniny 28.

TLC: $R_f = 0,32$, silikagel, 6/1 (objemově) toluen/ethanol.

Příprava 26

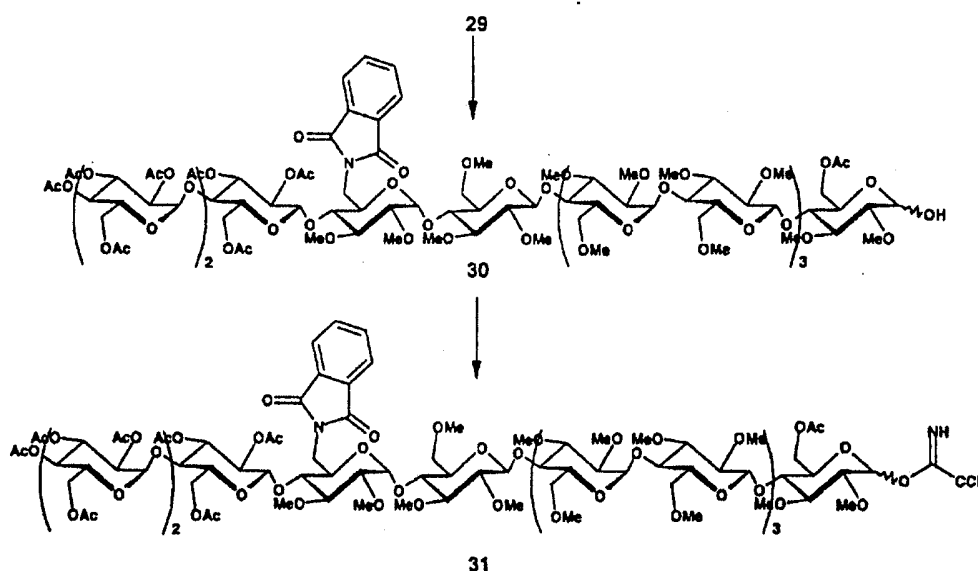
2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-acetyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosid (29)

51,1 μ l (0,368 mmol) Triethylaminu, 32,5 μ l (0,344 mmol) anhydridu kyseliny octové a 6,0 mg (0,049 mmol) dimethylamino-

pyridinu se přidá k roztoku 728 mg (0,245 mmol) sloučeniny 28 v 10 ml dichlormethanu. Po 1 hodině míchání se reakční směs zředí dichlormethanem, postupně se promyje 10% roztokem hydrogenuhlíčitanu draselného, vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným a odpaří se ve vakuu. Po čištění zbytku pomocí kolonové chromatografie na silikagelu se získá 0,618 g sloučeniny 29.

TLC: $R_f = 0,37$, silikagel, 6/1 (objemově) toluen/ethanol.

Schéma 6 - Syntéza oligosacharidu 31



Příprava 27

(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl) - (1 $\rightarrow$ 4) - (2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl) - (1 $\rightarrow$ 4) - (2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl) - (1 $\rightarrow$ 4) - (6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl) - (1 $\rightarrow$ 4) - (2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl) - (1 $\rightarrow$ 4) - [(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl) - (1 $\rightarrow$ 4) - (2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl) - (1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-D-glukopyranosa (30)

Roztok 579 mg (0,192 mmol) sloučeniny 29 v 11,5 ml směsi 2/1 (objemově) trifluoroctová kyseliny/dichlormethan se míchá 1 hodinu. Reakční směs se zředí 69 ml směsi 2/1 (objemově) toluen/n-propylacetát, odpaří se a potom se odpaří společně s toluenem. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí 5/1 (objemově) toluen/ethanol a získá se 523 mg sloučeniny 30.

TLC: $R_f = 0,31$, silikagel, 5/1 (objemově) toluen/ethanol.

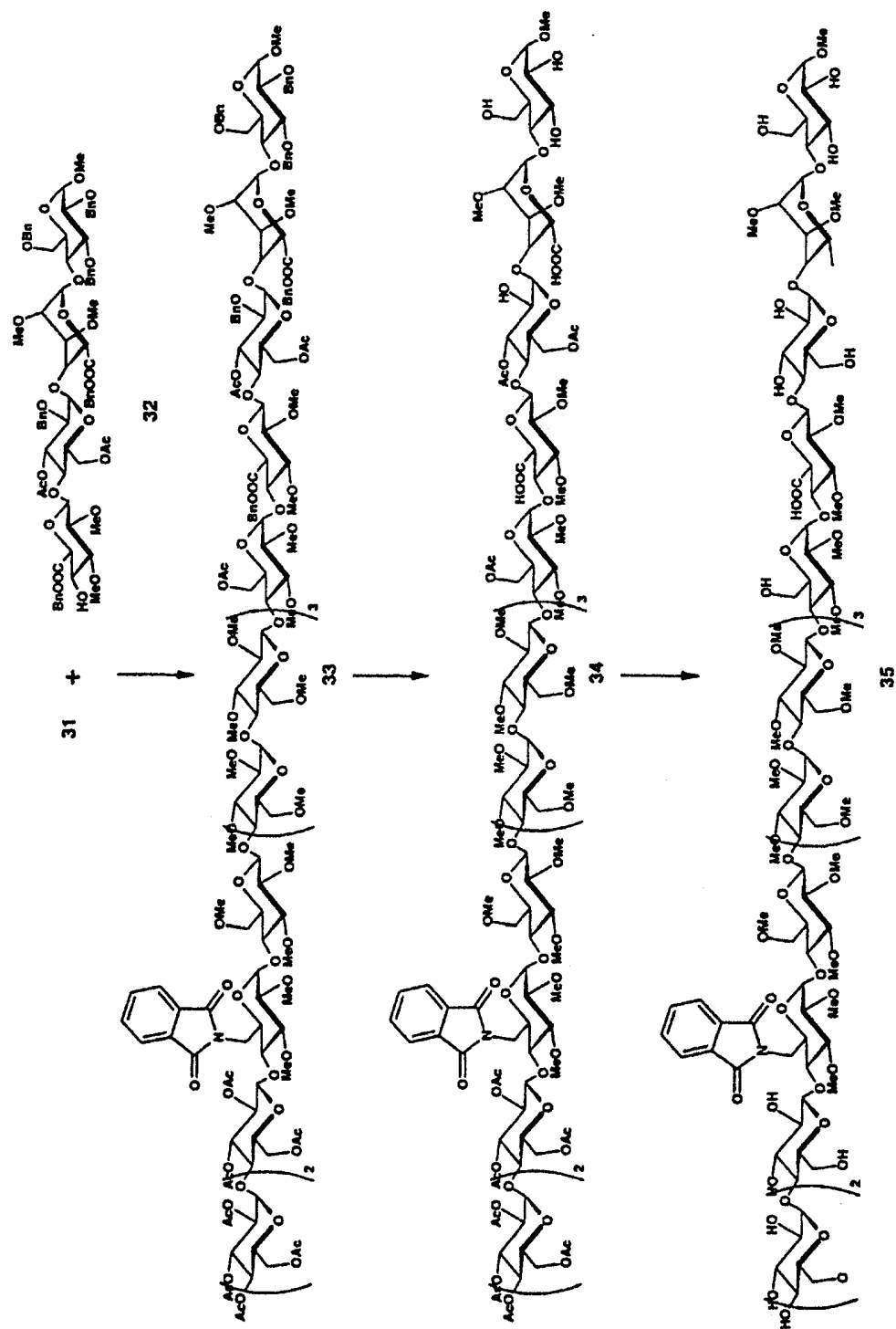
Příprava 28

Trichloracetimidát (2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-D-glukopyranosy (31)

65,5 μ l (0,85 mmol) Trichloracetonitrilu a 88,4 mg (0,27 mmol) uhličitanu cesného se přidá k 3 ml roztoku sloučeniny 30 v dichlormethanu. Po 2 hodinách míchání se směs filtruje a odpaří. Zbytek se čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí 6/1 (objemově) toluen/ethanol + 0,1% triethylaminu a získá se 477 mg sloučeniny 31.

TLC: $R_f = 0,35$, silikagel, 6/1 (objemově) toluen/ethanol.

Schéma 7 - Synthéza hexadecasacharidu 35



Příprava 29

Methyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-acetyl-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-(3,6-di-O-acetyl-2-O-benzyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(benzyl-2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-benzyl- α -D-glukopyranosid (33)

370 mg (0,121 mmol) imidátu 31 a 336 mg (0,242 mmol) sloučeniny 32 (připravené podle postupu popsaneho v P. Westerduin a kol., Bioorg. Med. Chem., 1994, 2, 1267) se rozpustí v 5,5 ml směsi 1/2 (objemově) dichlormethan/diethylether. Po přidání 4Å práškových molekulových sít se směs ochladí na -20 °C a přidá se 181,5 μ l 0,1M roztoku trimethylsilyltrifluormethan-sulfonátu v dichlormethanu. Po 25 minutách se směs neutralizuje přidáním pevného hydrogenuhličitanu sodného. Po filtraci a odpaření se zbytek čistí pomocí chromatografie na gelu Sephadex® LH20, potom pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 6/5 (objemově) toluen/acetone a získá se 302 mg sloučeniny 33.

$[\alpha]_D = +86^\circ$ (c = 1, dichlormethan).

Příprava 30

Methyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-

ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-acetyl-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(3,6-di-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glukopyranosid (34)

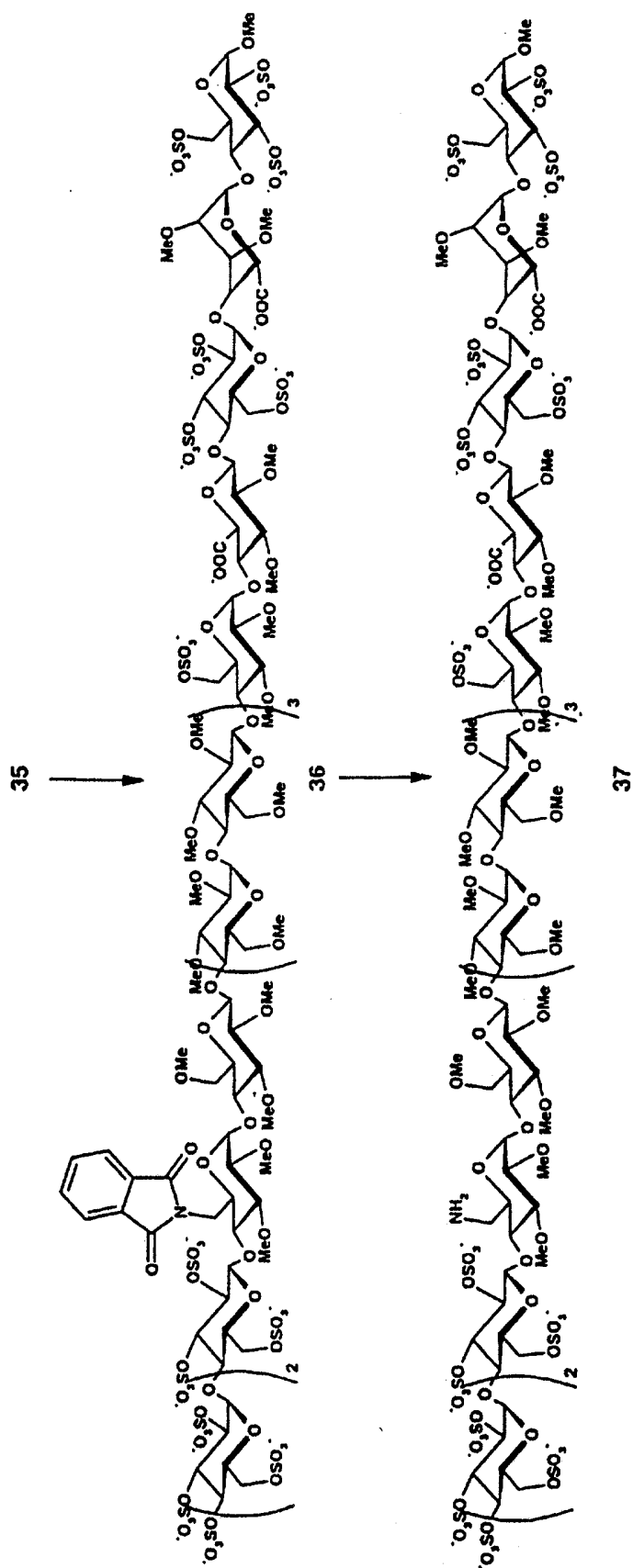
Roztok 104 mg (0,024 mmol) sloučeniny 33 v 5 ml kyseliny octové se hydrogenuje při tlaku 400 kPa v přítomnosti 104 mg palladia na uhlí 4 hodiny. Po filtraci se roztok lyofilizuje a získá se 87 mg sloučeniny 34, která se použije v následujícím kroku bez dalšího čištění.

Příprava 31

Methyl-(α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glukopyranosid (35)

140 μ l Molárního roztoku methoxidu sodného se v přítomnosti 875 mg 3Å práškových molekulových sít přidá k roztoku 80 mg (0,021 mmol) sloučeniny 34 v 6,9 ml bezvodého methanolu. Po 20 hodinách při teplotě místnosti se reakční směs filtruje a filtrát se neutralizuje kyselinou octovou. Roztok se odpaří na polovinu a nanese se na gelovou kolonu Sephadex® G-25 Fine (3 x 92 cm). Po eluci vodou a lyofilizací se získá 66 mg sloučeniny

Schéma 8 - Synthéza oligosacharidu 37



Příprava 32

Sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-deoxy-2,3-di-O-methyl-6-ftalimido- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu (36)

66,4 mg (0,021 mmol) polyolu 35 se rozpustí v 1,8 ml N,N-dimethylformamidu. Přidá se 320 mg (1,77 mmol) komplexu oxid sírový/triethylamin a směs se míchá 20 hodin při 55 °C. Roztok se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine (3 x 92 cm) a eluuje se 0,2M chloridem sodným. Frakce obsahující produkt se odpaří a odsolení se provede za použití stejné kolony za eluce vodou. Po lyofilizaci se získá 83 mg sloučeniny 36.

Hmota: metoda ESI, negativní mód: chemická hmota = 4968,92; experimentální hmota = 4966,52 $\pm$ 0,16 a.m.u.

Příprava 33

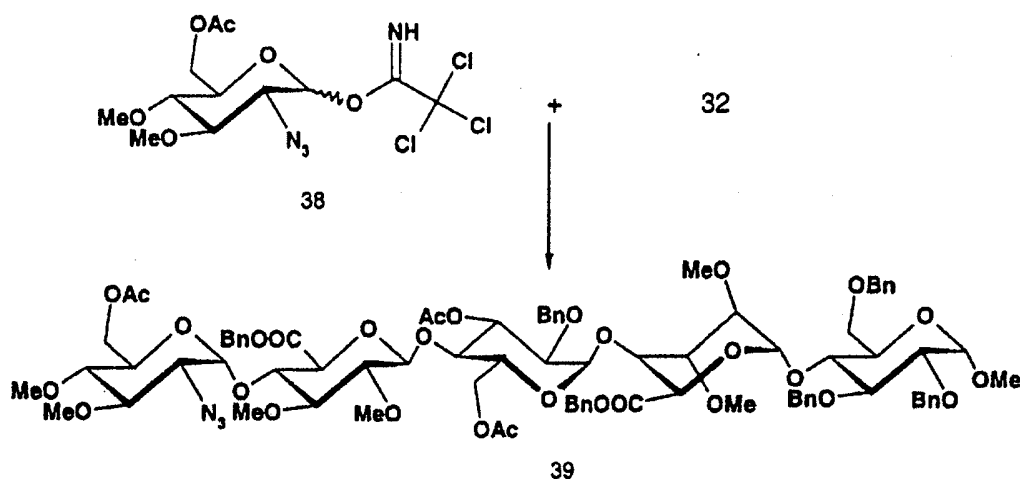
Sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-amino-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu (36)

syl)-(1→4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -Dglukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosid (37)

83 mg (0,017 mmol) sloučeniny 36 se rozpustí v 1,67 ml směsi 2/1 (objemově) ethanol/voda. Přidá se 81,2 μ l (1,67 mmol) hydrátu hydrazinu a směs se 20 hodin zahřívá k varu pod zpětným chladičem. Roztok se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine (3 x 92 cm) a eluuje se vodou. Po odpaření frakcí obsahujících produkt se zbytek rozpustí v 5,00 ml směsi ethanol/voda a znovu se reaguje za podmínek uvedených výše s 81,2 μ l hydrátu hydrazinu a získá se 71 mg sloučeniny 37.

Hmota: Metoda ESI, negativní mód: chemická hmota = 4838,32; experimentální hmota = 4814,6 $\pm$ 0,70 a.m.u.

Schéma 9 - Syntéza pentasacharidu 39



Příprava 34

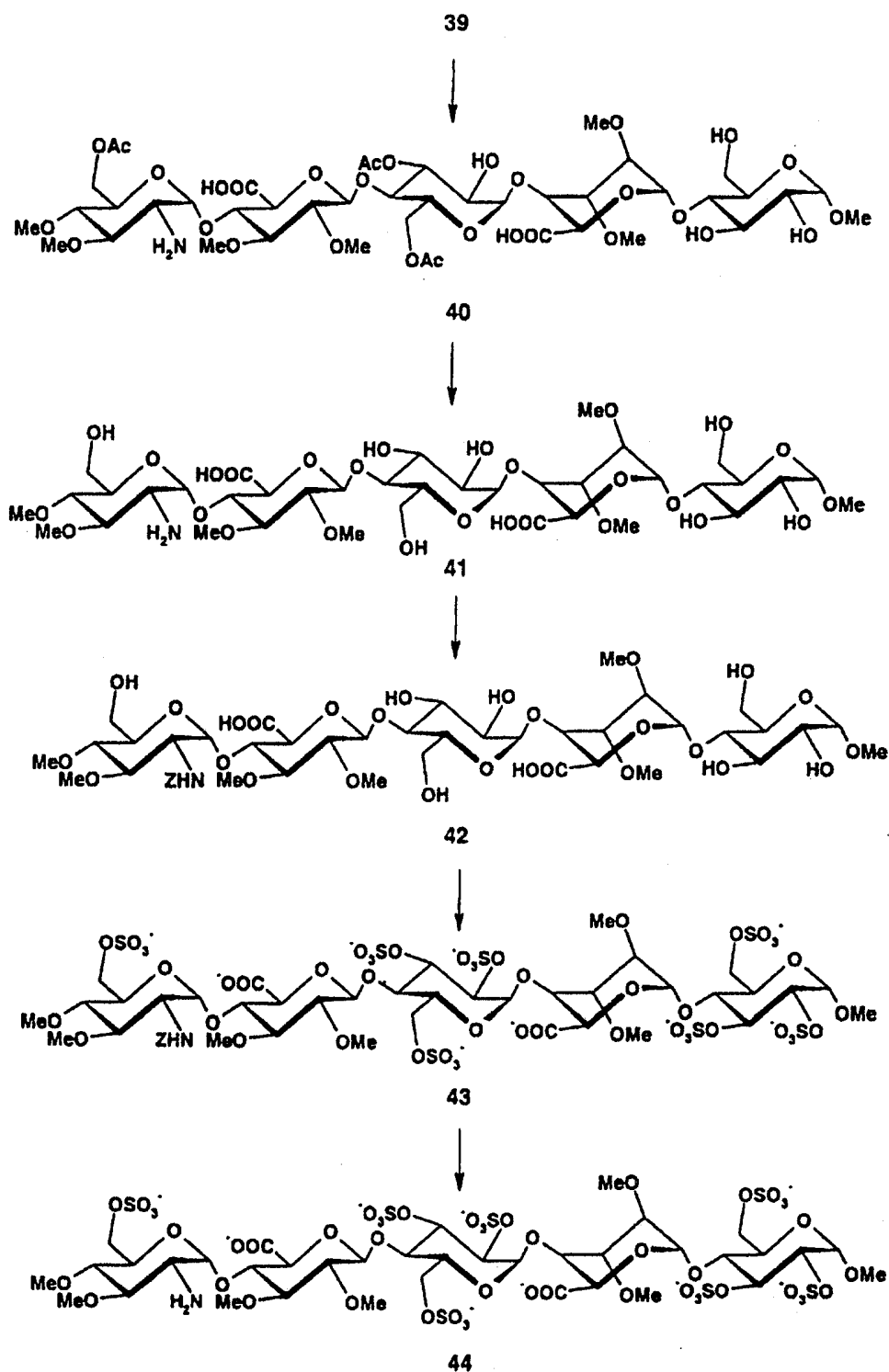
Methyl-(6-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(benzyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyl-

uronát)-(1→4)-(3,6-di-O-acetyl-2-O-benzyl- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(benzyl-2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronát)-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzyl- α -D-glukopyranosid (39)

265 mg (0,631 mmol) trichloracetimidátu 6-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl- α,β -D-glukopyranózy 38 získaného podle postupu popsaneho v J. Basten a kol., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1992), 2(9), 901) a 584 mg (0,420 mmol) sloučeniny 32 (získané podle postupu popsaneho v P. Westerduin a kol., *Bioorg. Med. Chem.*, 1994, 2, 1267) se rozpustí v 28,5 ml směsi 1/2 (objemově) dichlormethan/diethylether. Po přidání práškových 4Å molekulových sít se směs ochladí na -20 °C a přidá se 94,6 μ l 0,1M roztoku trimethylsilyltrifluormethansulfonátu v dichlormethanu. Po 10 minutách se znovu přidá 53,8 mg imidátu, potom 19,2 μ l 0,1M roztoku trimethylsilyltrifluormethansulfonátu v dichlormethanu. Po 10 minutách se směs neutralizuje přidáním pevného hydrogenuhličitanu sodného. Po filtraci a odpaření se zbytek čistí pomocí chromatografie na koloně silikagelu za eluce směsí 3/1 (objemově) toluen/ethylacetát a získá se 499 sloučeniny 39.

$[\alpha]_D = +66^\circ$ (c = 1,07, dichlormethan).

Schéma 10 - Syntéza pentasacharidu 44 (způsob I)



Příprava 35

Methyl-(6-O-acetyl-2-amino-2-deoxy-3,4-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová

kyselina) - (1→4) - (3,6-di-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl) - (1→4) - (2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina) - (1→4) - α -D-glukopyranosid (40)

Roztok 552,6 mg (0,335 mmol) sloučeniny 39 v 16 ml směsi 5/1 (objemově) terc-butanol/ethylacetát se hydrogenuje při tlaku 1 MPa v přítomnosti 1,10 g 10% palladia na uhlí a 0,336 ml 1M kyseliny chlorovodíkové 4,5 hodiny. Po filtraci se roztok odpaří a získá se sloučenina 40, která se použije v dalším kroku bez čištění.

Příprava 36

Methyl - (2-amino-2-deoxy-3,4-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl) - (1→4) - (2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina) - (1→4) - (α -D-glukopyranosyl) - (1→4) - (2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina) - (1→4) - α -D-glukopyranosid (41)

324 mg (0,300 mmol) sloučeniny 40 se rozpustí v 8,8 ml methanolu. Přidají se 2,2 ml 5M roztoku hydroxidu sodného a reakční směs se míchá 16 hodin při teplotě místnosti. Neutralizuje se na pryskyřici Dowex® 50 H⁺ a filtruje se. Roztok se přefiltruje přes kolonu Sephadex® G-25 Fine za eluce vodou. Frakce obsahující produkt se odpaří a získá se 254,2 mg sloučeniny 41. V tomto stupni se potvrdí pomocí NMR, že byly odstraněny chránící skupiny (benzylová skupina a acetylová skupina).

TLC: R_f = 0,26, silikagel, 5/5/1/3 (objemově) ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda.

Příprava 37

Methyl - (2-(benzyloxykarbonyl)amino-2-deoxy-3,4-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl) - (1→4) - (2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina) - (1→4) - (α -D-glukopyranosyl) - (1→4) - (2,3-di-O-

methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glukopyranosid (42)

241,1 mg (0,253 mmol) sloučeniny 41 se rozpustí v 12,4 ml vody a přidá se 63,7 mg hydrogenuhličitanu sodného a potom se přikape 41 μ l benzylchloroformiátu. Po 12 hodinách míchání se reakční směs nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine a eluuje se vodou. Frakce obsahující produkt se odpaří. Po čištění pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 21/17/3,6/10 objemově ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda se získá 221 mg sloučeniny 42.

TLC: R_f = 0,63, silikagel, 5/5/1/3 (objemově) ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda.

Příprava 38

Sodná sůl methyl-(2-(benzyloxykarbonyl)amino-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu (43)

19,6 mg (0,018 mmol) polyolu 42 se rozpustí v 1,62 ml N,N-dimethylformamidu. Přidá se 114 mg komplexu oxid sírový-triethylamin a směs se míchá 20 minut při 55 °C s vyloučením světla. Roztok se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine a eluuje se 0,2M chloridem sodným. Frakce obsahující produkt se odpaří a odsolí se za použití stejné kolony za eluce vodou. Po lyofilizaci se získá 28,3 mg sloučeniny 43.

$[\alpha]_D = +48^\circ$ ($c = 2,75$, voda).

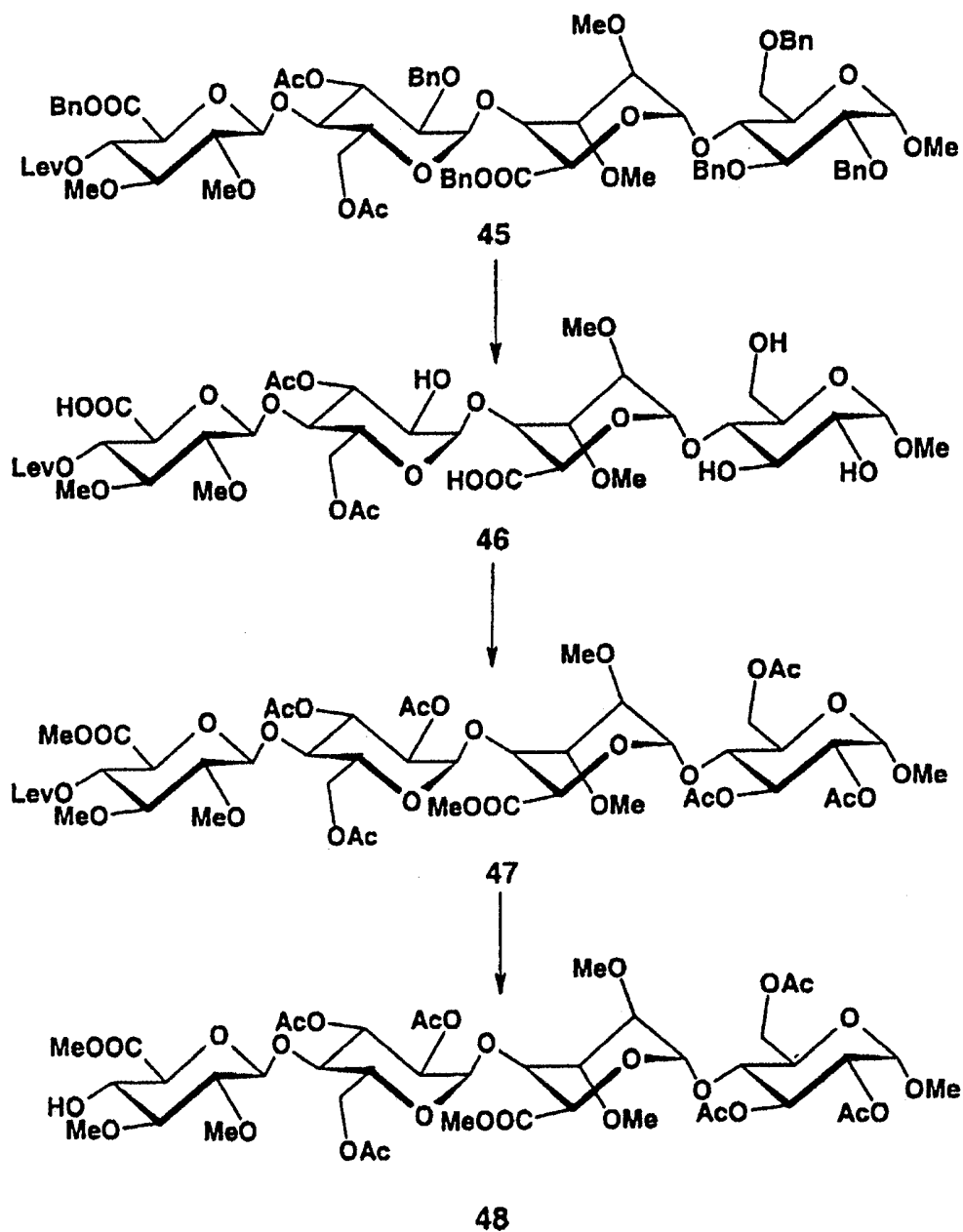
Příprava 39

Sodná sůl methyl-(2-amino-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu (44)

Roztok 27,5 mg (0,015 mmol) sloučeniny 43 ve směsi 333 μ l terc-butanolu a 500 μ l vody se hydrogenuje při tlaku vodíku 500 kPa v přítomnosti 8,25 mg 10% palladia na uhlí 16 hodin. Po filtraci se roztok odpaří a zbytek se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine (3 x 92 cm). Po eluování vodou a lyofilizací se získá 23,7 mg sloučeniny 44.

$[\alpha]_D = +58^\circ$ (c = 1, voda).

Schéma 11 - Syntéza tetrasacharidu 48



Příprava 40

Methyl-(4-O-levulinylnyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(3,6-di-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glukopyranosid (46)

Roztok 4,50 g (3,02 mmol) sloučeniny 45 (získané podle postupu popsaného v P. Westerduin a kol., *BioOrg. Med. Chem.*, 1994, 2, 1267) v 72 ml směsi ethylacetát/terc-butanol (1/1, objemově) se reaguje při tlaku vodíku 400 kPa v přítomnosti 9,0 g 10% palladia na uhlí 6 hodin. Po filtraci a odpaření se získaná sloučenina 46 použije přímo, bez čištění v následujícím kroku.

TLC: R_f = 0,54, 26/22/4,6/17 objemově ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda.

Příprava 41

Methyl-(methyl-4-O-levulinyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -Dglukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(methyl-2,3-di-D-methyl- α -Lidopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosid (47)

2,71 g hydrogenuhličitanu draselného a 3,4 ml methyljodidu se při 0 °C přidá k 2,57 g (2,71 mmol) sloučeniny 46 v 35 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu. Po 16 hodinách míchání při teplotě místnosti se reakční směs ochladí na 0 °C. Potom se postupně přidá 132 mg dimethylaminopyridinu a 1,5 ml anhydridu kyseliny octové. Směs se míchá 16 hodin. Po neutralizaci přebytku anhydridu kyseliny octové se směs zředí ethylacetátem. Organická fáze se postupně promyje 10% roztokem hydrogensíranu sodného a potom nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným, filtruje se potom se odpaří do sucha. Zbytek se čistí pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 9/5 cyklohexan/(1/1 ethylacetát/ethanol) a získá se 2,51 g sloučeniny 47.

TLC: R_f = 0,41, 2/1 objemově toluen/acetone.

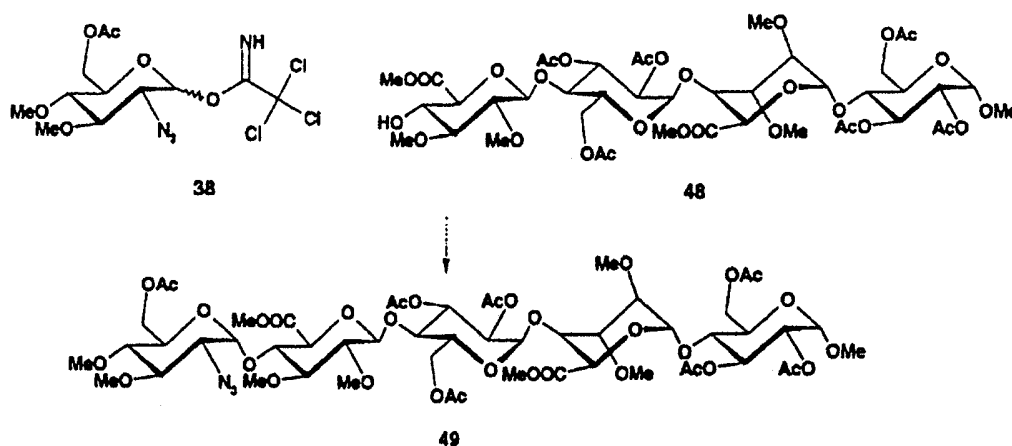
Příprava 42

Methyl-(methyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(methyl-2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-acetyl- α -D-glukopyranosid (48)

2,5 g (2,56 mmol) sloučeniny 47 se rozpustí v 500 ml směsi 1/1 objemově toluen/ethanol. Přidá se 1,01 g acetátu hydrazinu. Po 2 hodinách míchání při teplotě místnosti se reakční směs odpaří do sucha. Zbytek se rozpustí v dichlormethanu. Organická fáze se postupně promyje 2% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným, filtruje se a odpaří se do sucha. Po čištění pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 1/4 (objemově) toluen/ethylacetát se získá 2,01 g sloučeniny 48.

TLC: R_f = 0,37, 2/1 objemově toluen/aceton.

Schéma 12: Syntéza pentasacharidu 49



Příprava 43

Methyl-(6-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(methyl-2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetyl- α -Dglukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-

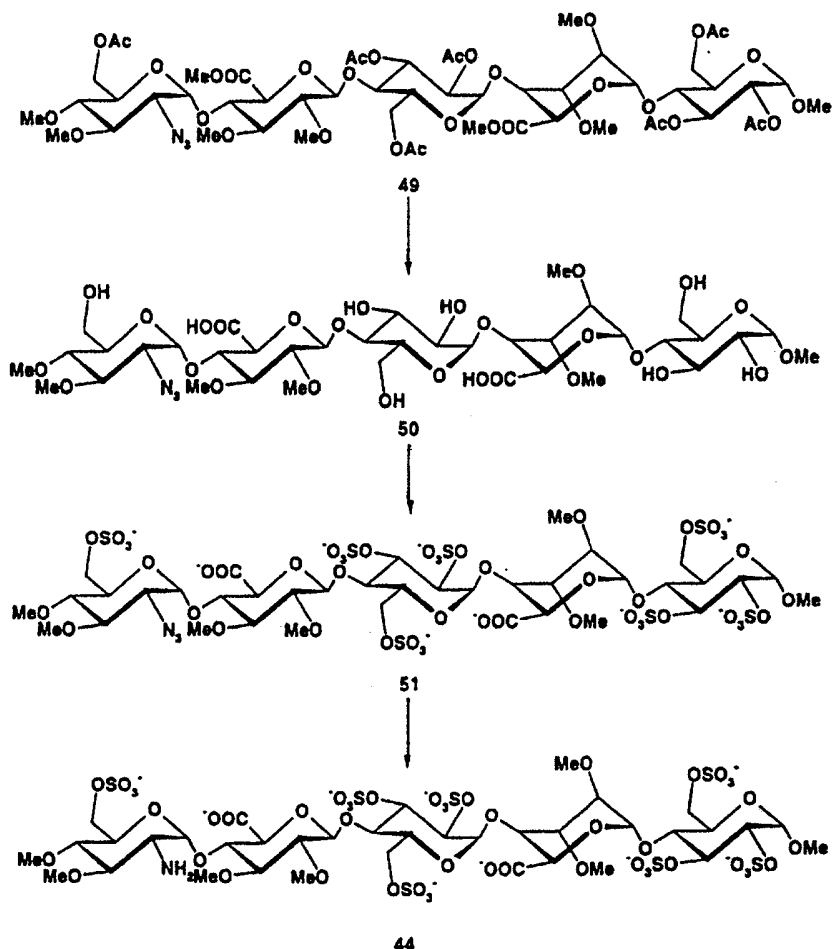
(methyl-2,3,-di-O-methyl- α -Lidopyranosyluronát) - (1 $\rightarrow$ 4) -2,3,6-tri-O-acetyl- α -Dglukopyranosid (49)

1,18 g (2,81 mmol) imidátu 38 (získaného podle postupu popsaného v J. Basten a kol., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1992), 2(9), 901) a 1,83 g (1,75 mmol) sloučeniny 48 se rozpustí v 126 ml směsi 1/2 (objemově) dichlormethan/diethylether. Po přidání práškových 4Å molekulových sít se směs ochladí na -20 °C a přidá se 421 μ l 1M roztoku terc-butyldimethylsilyltrifluormethansulfonátu v dichlormethanu. Po 30 minutách se přidá dalších 266 mg imidátu a 168 μ l 1M roztoku terc-butyldimethylsilyltrifluormethansulfonátu v dichlormethanu. Po 10 minutách se směs neutralizuje přidáním pevného hydrogenuhličitanu sodného a filtruje se. Roztok se převrství dichlormethanem, postupně se promyje 2% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vodou, suší se nad síranem sodným a potom se odpaří ve vakuu. Získaný zbytek se čistí pomocí kolonové chromatografie na silikagelu za eluce směsí 4/3 a potom 1/1 objemově dichlormethan/ethylacetát a získá se 1,814 g sloučeniny 49.

TLC: R_f = 0,57, 3/1 objemově toluen/ethylacetát.

$[\alpha]_D = +93^\circ$ (c = 1,15, dichlormethan).

Schéma 13: Syntéza pentasacharidu 44 (způsob II)



Příprava 44

Methyl-(2-azido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glukopyranosid (50)

42 ml 30% vodného roztoku peroxidu vodíku se při $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ přidá k roztoku 845,3 mg sloučeniny 49 v 104 ml tetrahydrofuranu. Po 5 minutách míchání se přikape 0,7M vodný roztok hydroxidu lithného. Reakční směs se míchá 1 hodinu při $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, potom 4 hodiny při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nakonec 16 hodin při teplotě místnosti. Neutralizuje se 1M roztokem kyseliny chlorovodíkové. Roztok se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine (5 x 1 000 cm) a eluuje

se vodou. Frakce obsahující očekávanou sloučeninu se spojí, odpaří se a nanesou se na kolonu obsahující 50 ml pryskyřice Dowex AG 50 WX4 H⁺. Sloučenina se odebere při 0 °C a odpaří se za získání 618 mg sloučeniny 50.

TLC: R_f = 0,56, 26/22/4,6/17 objemově ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda.

Příprava 45

Sodná sůl methyl-(2-azido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -Lidopyranosyluronát)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu (51)

Bezprostředně před použitím se sloučenina 50 destiluje třikrát s 29 ml N,N-dimethylformamidu. K roztoku 612 mg (0,624 mmol) sloučeniny 50 v 58 ml N,N-dimethylformamidu se přidá 3,84 g komplexu oxid sírový-triethylamin. Směs se míchá 16 hodin při 55 °C za nepřístupu světla. Směs se ochladí na 0 °C, a přikape se k ní roztok 5,33 g hydrogenuhličitanu sodného v 200 ml vody. Směs se míchá 16 hodin při teplotě místnosti a odpaří se do sucha. Zbytek se rozpustí ve vodě a roztok se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine a eluuje se 0,2M roztokem chloridu sodného. Frakce obsahující produkt se odpaří a odsolí se za použití stejné kolony za eluce vodou. Po lyofilizaci se získá 1,06 g sloučeniny 51.

TLC: R_f = 0,5, 3/5/1/3 objemově ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda.

Příprava 46

Sodná sůl methyl-(2-amino-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyrano-

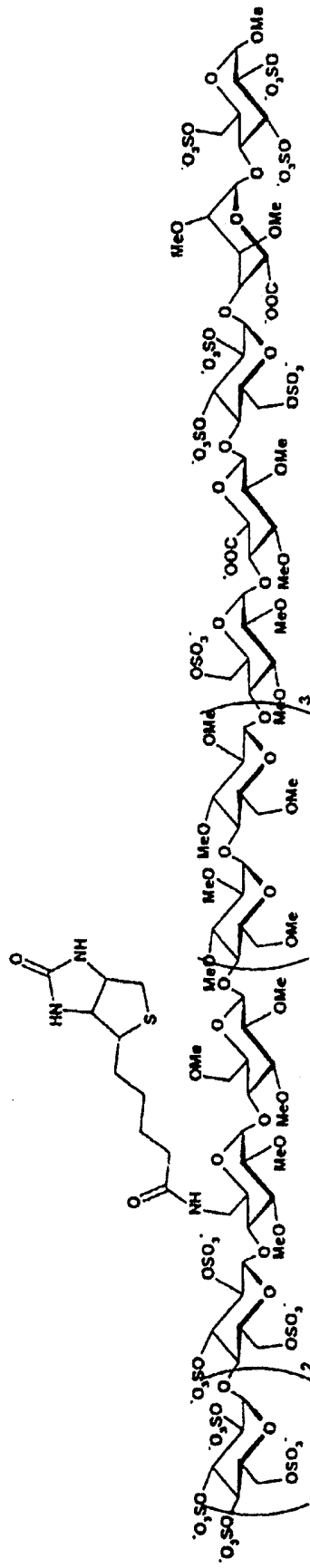
syluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu (44)

Tato hydrogenolýza se provede dvakrát a v každém případě na 534,4 mg sloučeniny 51.

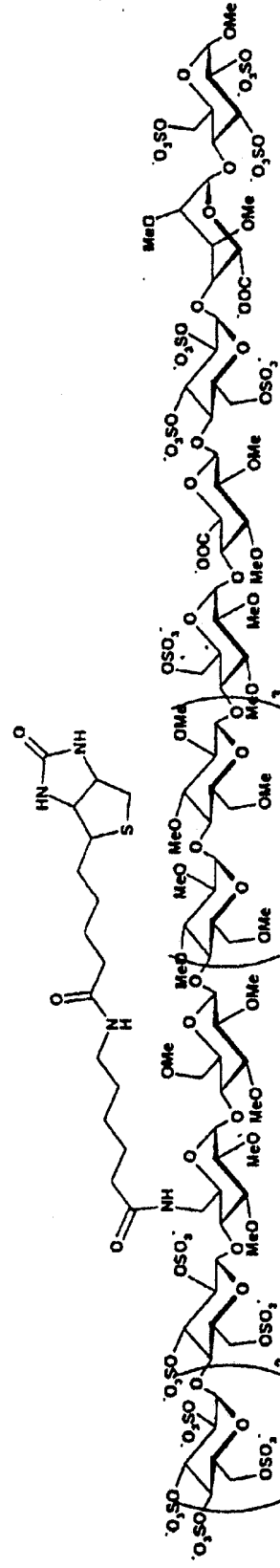
Roztok 534,4 mg sloučeniny 51 ve směsi 6,7 ml (12,6 ml/g) terc-butanolu a 10 ml (19 ml/g) vody se reaguje s vodíkem za tlaku 500 kPa v přítomnosti 160 mg 10% palladia na uhlí 4 hodiny při 40 °C. Po filtraci (filtr Millipore® LSWP 5 μ m) se roztok odpaří do sucha a získá se 530 mg sloučeniny 44.

TLC: R_f = 0,49, 3/5/1/3 objemově ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda.

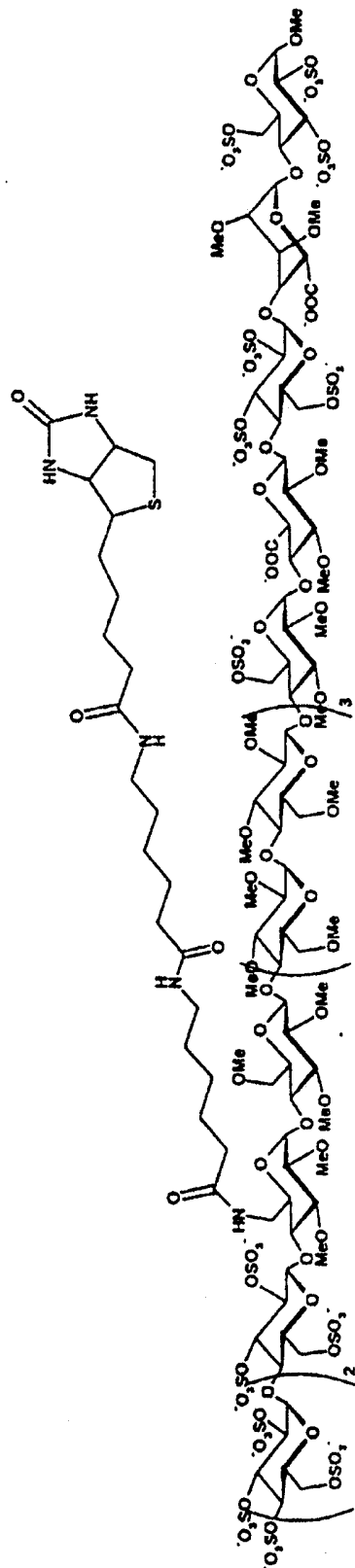
Příklad 1



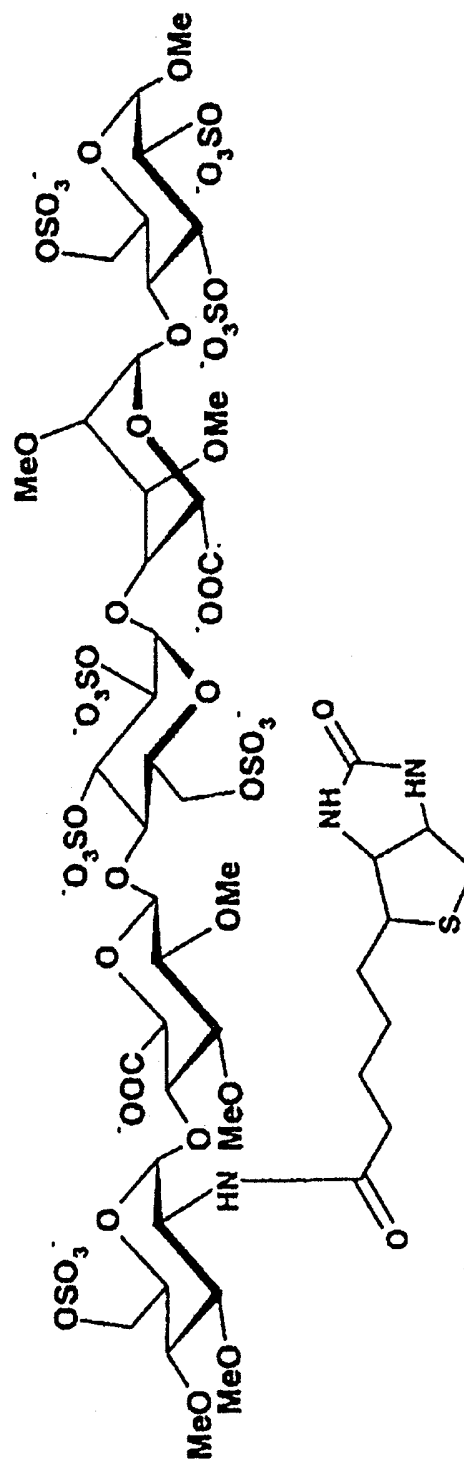
Příklad 2



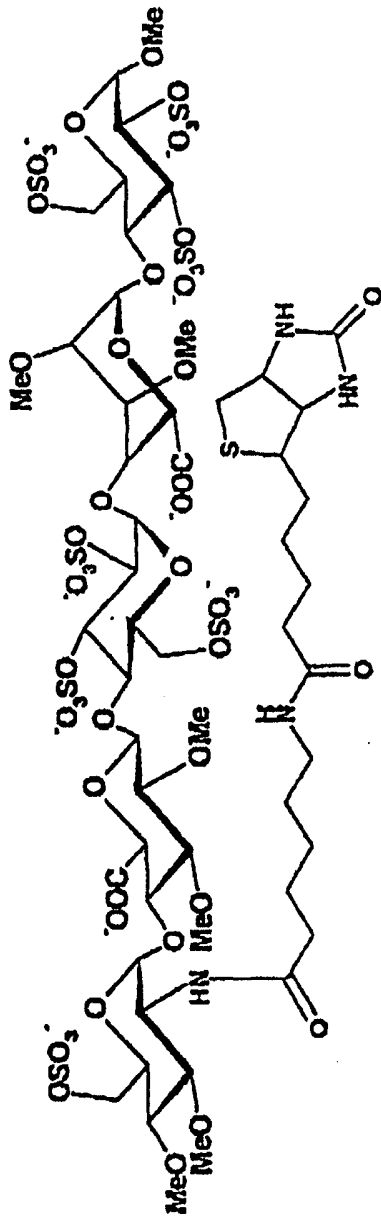
Příklad 3



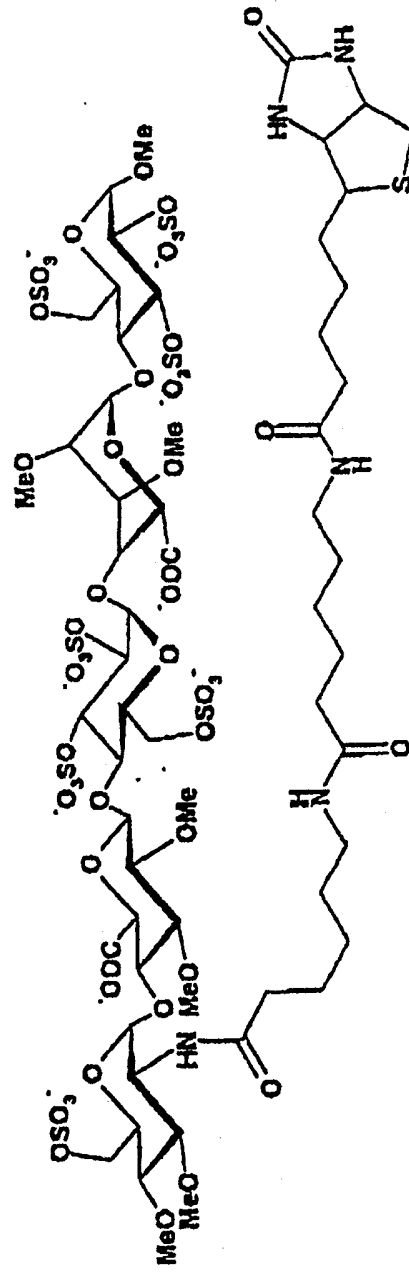
Příklad 4



Příklad 5



Příklad 6



Příklad 1

Sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-biotinamido-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu

16,5 mg sulfosukcinimidu biotinu se přidá k roztoku 18 g (3,72 μ mol) sloučeniny 37 v 1,5 ml 0,5% roztoku hydrogenuhličitanu sodného.

Po 16 hodinách míchání při teplotě místnosti se reakční směs nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine a eluuje se roztokem chloridu sodného.

Frakce obsahující produkt se odpaří a odsolí se za použití stejné kolony za eluce vodou.

Po lyofilizaci se získá 15,9 mg sloučeniny z příkladu 1.

$[\alpha]_D = +59^\circ$ ($c = 0,78$, voda).

Hmota: metoda ESI, negative mód: chemická hmota = 5065,12; experimentální hmota = 5064,18 $\pm$ 1,04 a.m.u.

Příklad 2

Sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamido)hexamido]-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu

16,5 mg 6-(biotinamido)hexanoátu se přidá k roztoku 18 mg (3,72 μ mol) sloučeniny 37 v 1,5 ml 0,5% roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Po 16 hodinách míchání při teplotě místnosti se reakční směs nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine a eluuje se roztokem chloridu sodného.

Frakce obsahující produkt se odpaří a odsolí se za použití stejné kolony za eluce vodou.

Po lyofilizaci se získá 17,9 mg sloučeniny z příkladu 2.

$[\alpha]_D = +60^\circ$ ($c = 1,0$, voda).

Hmota: metoda ESI, negativní mód: chemická hmota = 5178,28; experimentální hmota = 5176,3 $\pm$ 0,77 a.m.u.

Příklad 3

Sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(6-

biotinamidohexamido)hexamido]-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tro-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu

23,6 mg Sulfosukcinimidyl-6-(6-biotinamidohexamido)hexanoátu se přidá k roztoku 17 mg (3,51 μ mol) sloučeniny 37 v 1,4 ml 0,5% hydrogenuhlíčitanu sodného.

Po 16 hodinách míchání při teplotě místnosti se reakční směs nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine a eluuje se chloridem sodným a odsolí se za použití stejné kolony a eluce vodou.

Po lyofilizaci se získá 17,4 mg sloučeniny z příkladu 3.

$[\alpha]_D = +64^\circ$ ($c = 1,0$, voda).

Hmota: metoda ESI, negativní mód: chemická hmota = 5291,44; experimentální hmota = 5292,1 $\pm$ 0,83 a.m.u.

Příklad 4

Sodná sůl methyl-(2-biotinamido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu

Roztok 42 mg biotin-N-hydroxysukcinimidu v 750 μ l N,N-dimethylformamidu se přidá k roztoku 21,2 mg (0,012 mmol) slouče-

niny 44 v 750 μ l 0,5% hydrogenuhličitanu sodného. Po 16 hodinách míchání při teplotě místnosti se reakční směs nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine.

Po eluci vodou a lyofilizací se získá 22,3 mg sloučeniny z příkladu 4.

$[\alpha]_D = +38^\circ$ ($c = 0,15$, voda).

Hmota: metoda ESI, negativní mód: chemická hmota = 1938,48; experimentální hmota = $1937,48 \pm 0,11$ a.m.u.

Příklad 5

Sodná sůl methyl-(2-[N-(6-biotinamidohexanoyl)]-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu

Tato reakce se v každém případě provede dvakrát s 494,5 mg sloučeniny 44.

494,5 mg (0,289 mmol) sloučeniny 44 se rozpustí v 116 ml 0,5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného.

Potom se přikape roztok 1,46 g (2,63 mmol) sulfosukcinimidu 6-biotinamidohexanoátu v 12 ml 0,5% roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Po 16 hodinách míchání při teplotě místnosti se přidá 1M vodný roztok hydroxidu sodného a směs se míchá 1 hodinu. Reakční směs se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine (5 x 1000 cm) a eluuje se chloridem sodným.

Frakce obsahující produkt pocházející z obou reakcí se spojí.

Po lyofilizací se získá 999,2 mg sloučeniny z příkladu 5.

TLC: $R_f = 0,42$, 3/5/1/3 objemově ethylacetát/pyridin/kyselina octová/voda.

Hmota: metoda ESI, negativní mód: chemická hmota = 2051,64; experimentální hmota: $2051,60 \pm 0,43$ a.m.u.

Příklad 6

Sodná sůl methyl-(2-[6-(6-biotinamidohexamido)hexamido]-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu

30,1 mg (17,6 μ mol) sloučeniny 44 se rozpustí v 7 ml 0,5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Potom se přikape roztok 118 mg (176 μ l) sulfosukcinimidyl-6-(6-biotinamidohexamidu) v 1 ml 0,5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Po 16 hodinách míchání při teplotě místnosti se přidá 1M vodný roztok hydroxidu sodného a směs se míchá 1 hodinu. Reakční směs se nanese na kolonu Sephadex® G-25 Fine (2 x 85 cm) a eluuje se chloridem sodným.

Frakce obsahující produkt se spojí a odsolí se na koloně Sephadex® G-25 Fine (2 x 85 cm) za eluce vodou.

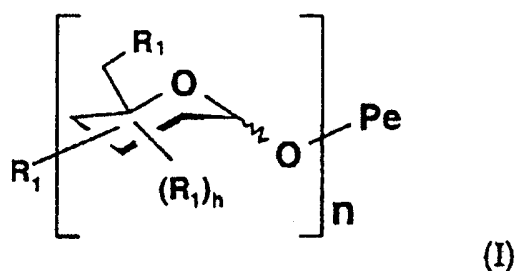
Po lyofilizaci se získá 26,5 mg sloučeniny z příkladu 6.

Hmota: metoda ESI, negativní mód: chemická hmota = 2164,48; experimentální hmota: $2164,29 \pm 0,38$ a.m.u.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

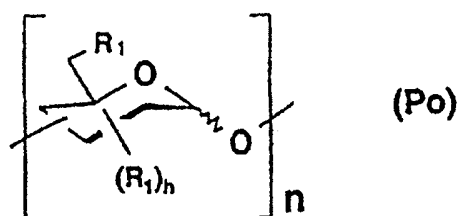
1. Syntetické polysacharidy s antitrombotickou aktivitou a jejich farmaceuticky přijatelné soli obsahující nejméně jednu kovalentní vazbu s biotinem nebo derivátem biotinu.

2. Polysacharidy podle nároku 1 obecného vzorce I

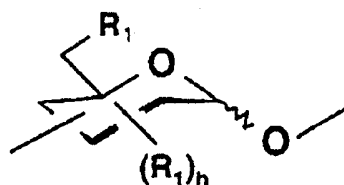


kde:

- kde vlnovka znamená vazbu umístěnou buď pod nebo nad rovinu pyranosového kruhu,



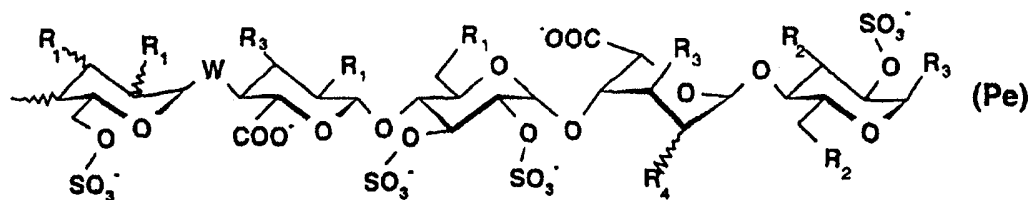
Po znamená polysacharid obsahující n stejných nebo různých monosacharidových jednotek vázaných prostřednictvím svého anomerního atomu uhlíku k Pe,



je schématické znázornění monosacharidové jednotky se strukturou pyranosy vybrané z hexos, pentos a odpovídajících deoxysacharidů, kdy tato jednotka je vázaná prostřednictvím anomer-

ního atomu uhlíku k další monosacharidové jednotce a hydroxylové skupiny této jednotky jsou substituované stejnými nebo různými skupinami R_1 , kde R_1 je definována dále,

- Pe je pentasacharid se strukturou:



- h je rovno 1 nebo 2,

- n je celé číslo a může nabývat hodnot 0 až 25,

- R_1 je můstek -T-Biot, alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,

- R_2 je můstek -T-Biot, alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,

- R_3 je můstek -T-Biot nebo alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku,

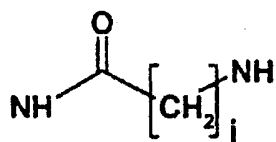
- R_4 je můstek -T-Biot, alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$ nebo jinak R_4 tvoří můstek $-\text{O}-\text{CH}_2-$, kde skupina $-\text{CH}_2-$ je vázaná k atomu uhlíku nesoucímu karboxylovou funkční skupinu na stejném kruhu;

rozumí se, že nejméně jedna ze skupin R_1 , R_2 , R_3 nebo R_4 je skupina -T-Biot,

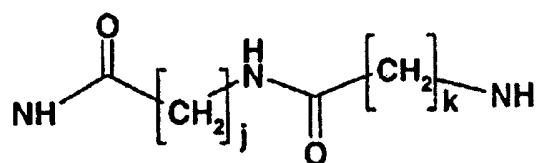
- W je atom kyslíku nebo methylenová skupina,

- T je můstek vybraný ze skupiny, kterou tvoří:

NH,

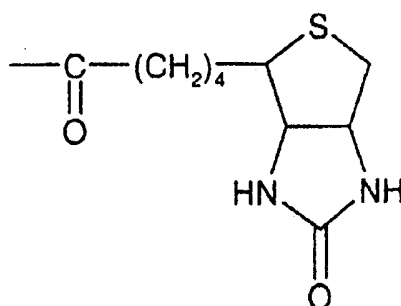


nebo



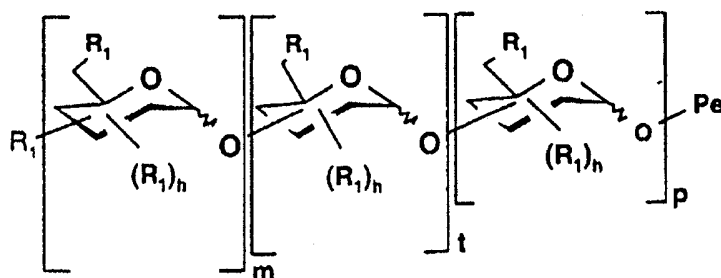
kde j a k , které jsou stejné nebo různé, jsou celá čísla, která mohou nabývat hodnot 1 až 10;

- Biot je skupina:



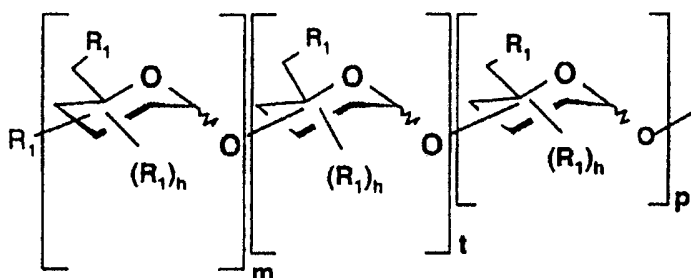
a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

3. Polysacharidy podle kteréhokoli z nároků 1 a 2 vzorce I.1:

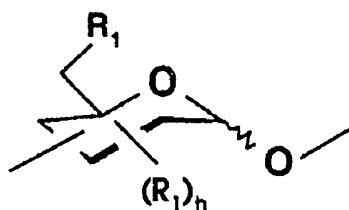


(I.1)

kde:



znamená zvláštní skupinu polysacharidů Po, které jsou vázány prostřednictvím svého anomerního atomu uhlíku k Pe, jak je definováno pro sloučeniny vzorce I,



je stejná, jako je definováno pro sloučeniny vzorce I,

- skupiny R_1 jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I a u stejného monosacharidu mohou být stejné nebo různé,

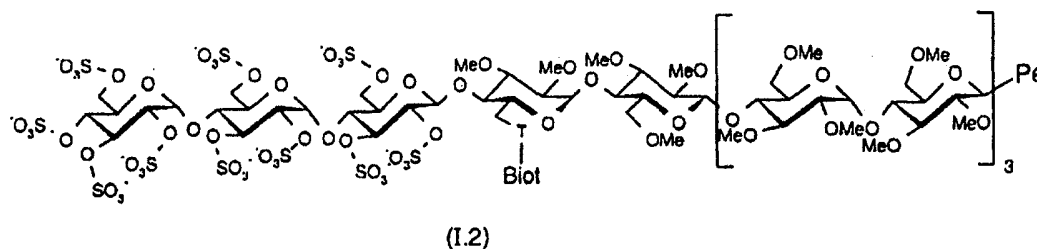
- monosacharid uvedený v $[]_m$ se opakuje m-krát, monosacharid uvedený v $[]_t$ se opakuje t-krát a monosacharid uvedený v $[]_p$ se opakuje p-krát,

- m je celé číslo pohybující se mezi 1 až 5, t je celé číslo pohybující se mezi 0 až 24 a p je celé číslo pohybující se mezi 0 až 24, přičemž se rozumí, že $1 \leq m + t + p \leq 25$,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

4. Polysacharidy podle nároku 3, kde pouze jedna ze skupin R_1 , R_2 , R_3 nebo R_4 je můstek T-Biot, kde T a Biot jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I.

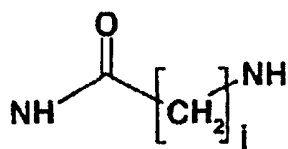
5. Hexasacharidy podle kteréhokoli z nároků 1 až 4 obecného vzorce I.2:



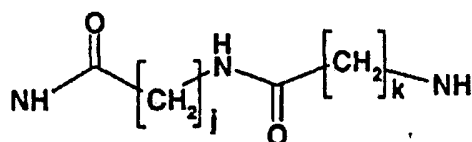
kde:

- T je můstek vybraný ze skupiny, kterou tvoří:

NH,

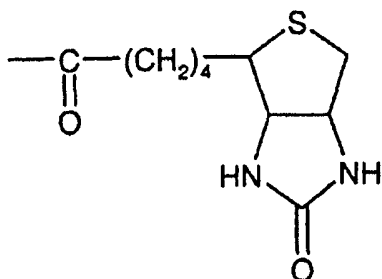


nebo

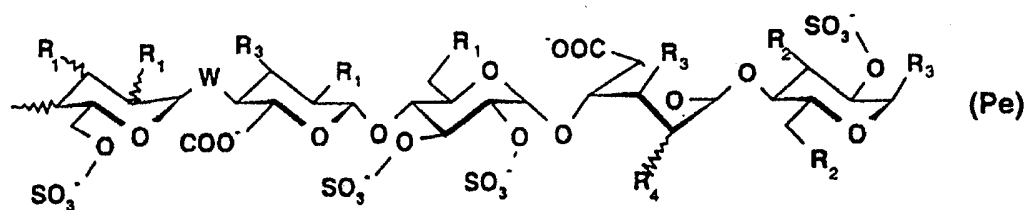


kde j a k, které jsou stejné nebo různé, jsou celá čísla pohybující se mezi 1 až 10;

- Biot je skupina



- Pe je pentasacharid struktury:



kde:

- R_1 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,

- R_2 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,

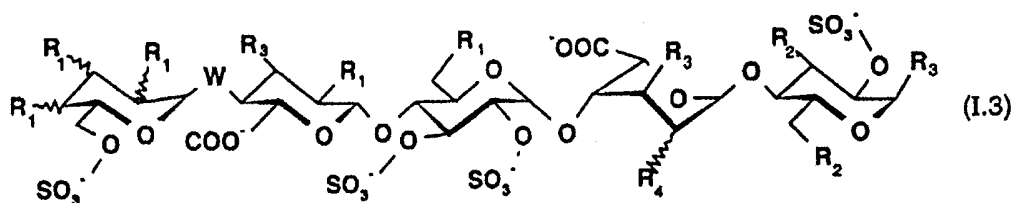
- R_3 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku,

- R_4 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$, nebo jinak R_4 tvoří můstek $-\text{O}-\text{CH}_2-$, kde skupina $-\text{CH}_2-$ je vázaná k atomu uhlíku nesoucímu karboxylovou funkční skupinu na stejném kruhu,

- W je atom kyslíku nebo methylenová skupina,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

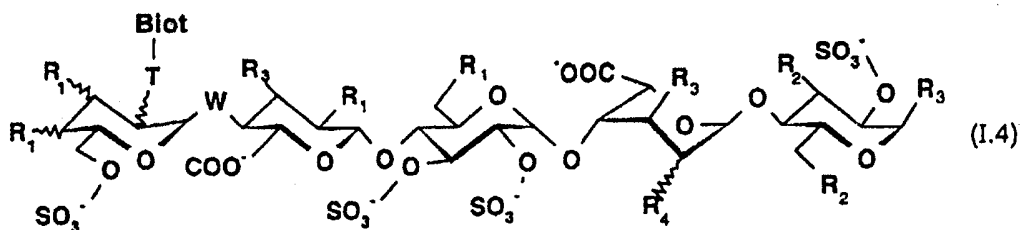
6. Pentasacharidy podle kteréhokoli z nároků 1 a 2 obecného vzorce I.3:



kde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 a W jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

7. Pentasacharidy podle nároku 6, kde pouze jedna ze skupin R_1 , R_2 , R_3 nebo R_4 je můstek -T-Biot, kde T a Biot jsou stejné, jako bylo definováno pro sloučeniny vzorce I.

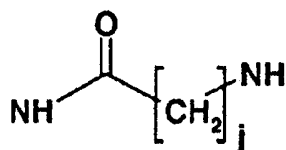
8. Pentasacharidy podle kteréhokoli z nároků 6 a 7 vzorce I.3 vzorce I.4:



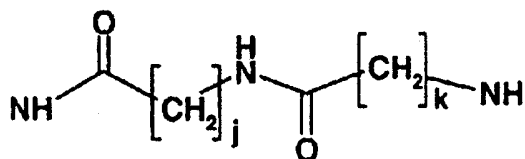
kde:

- T je můstek vybraný ze skupiny, kterou tvoří:

skupina NH,

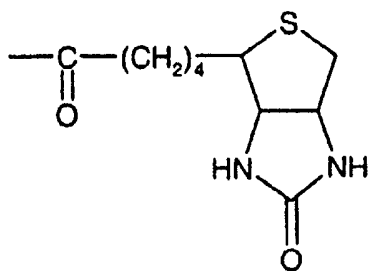


nebo



kde j a k, které jsou stejné nebo různé, jsou celá čísla, která mohou nabývat hodnot mezi 1 až 10;

- Biot je skupina:



- R_1 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,
 - R_2 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$,
 - R_3 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku,
 - R_4 je alkoxy skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku nebo skupina $-\text{OSO}_3^-$, nebo jinak R_4 tvoří můstek $-\text{O}-\text{CH}_2-$, kde skupina $-\text{CH}_2-$ je vázaná k atomu uhlíku nesoucímu karboxylovou funkční skupinu na stejném kruhu,
 - W je atom kyslíku nebo methylenová skupina,
- a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

9. Polysacharidy podle kteréhokoli z nároků 1 a 2 vybrané ze skupiny, kterou tvoří:

- sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-biotinamido-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-

(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-
2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamido)hexamido]-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(6-biotanamido)hexamido]-6-deoxy-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-methyl- β -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-methyl- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2-biotinamido-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-

glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2-[6-(6-biotinamidohexanoyl)]-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu,

- sodná sůl methyl-(2-[6-(6-biotinamidohexamido)hexamido]-2-deoxy-3,4-di-O-methyl-6-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- β -D-glukopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosyl)-(1→4)-(2,3-di-O-methyl- α -L-idopyranosyluronová kyselina)-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glukopyranosidu.

10. Farmaceutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje jako aktivní látku polysacharid podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, popřípadě v kombinaci s jednou nebo více inertními a vhodnými přísadami.

11. Použití farmaceutické kompozice podle nároku 10 při léčení onemocnění vznikajících jako důsledek homeostázy koagulačního systému vyskytující se při onemocněních kardiovaskulárního systému a cerebrovaskulárního systému, jako jsou tromboembolická onemocnění související s atherosklerózou a diabetem, například nestabilní angina, apoplexie, restenóza po angioplastice, endarterektómie nebo vložení endovaskulární protézy; nebo tromboembolická onemocnění související s retrombózou po trombolýze, s infarktem, s demencí ischemického původu, s onemocněními periferních arterií, s hemodialýzou nebo s aurikulární fibrilací, při použití cévních protéz při aortokoronárním bypassu, při léčení nebo prevenci tromboembolických

onemocnění žilního původu, jako je plicní embolie, při léčení nebo prevenci trombotických komplikací vyskytujících se po chirurgických operacích, růstu nádorů nebo poruchách koagulace vyvolaných bakteriemi, virovými nebo enzymatickými aktivátory.

12. Použití polysacharidu podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 pro potažení protéz.

13. Použití polysacharidu podle kteréhokoli z nároků 1 až 9 jako adjuvantu při endarterektomii prováděné pomocí porézních balónků.

14. Způsob použití avidinu nebo streptavidinu, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že umožňuje neutralizovat polysacharidy podle kteréhokoli z nároků 1 až 9.

15. Použití avidinu nebo streptavidinu při přípravě léčiv určených pro neutralizaci polysacharidů podle kteréhokoli z nároků 1 až 9.