

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 303 030

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C08B 37/10* (2006.01)  
*A61K 31/726* (2006.01)  
*A61K 31/727* (2006.01)  
*A61K 31/715* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-2308**  
(22) Přihlášeno: **24.01.2001**  
(30) Právo přednosti: **25.01.2000 IT RM00A000041**  
(40) Zveřejněno: **15.01.2003**  
(**Věstník č. 1/2003**)  
(47) Uděleno: **25.01.2012**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **07.03.2012**  
(**Věstník č. 10/2012**)  
(86) PCT číslo: **PCT/IT2001/000034**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/055221**

(56) Relevantní dokumenty:

WO 99/27976; US 4500519; US 5668118; US 5808021; US 5912237; WO 88/01280.

(73) Majitel patentu:

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE  
RIUNITE S. P. A., Roma, IT

(72) Původce:

Casu Benito, Milan, IT  
Torri Giangiacomo, Milan, IT  
Naggi Anna Maria, Milan, IT  
Pisano Claudio, Pomezia, IT  
Penco Sergio, Milan, IT  
Giannini Giuseppe, Pomezia, IT

(74) Zástupce:

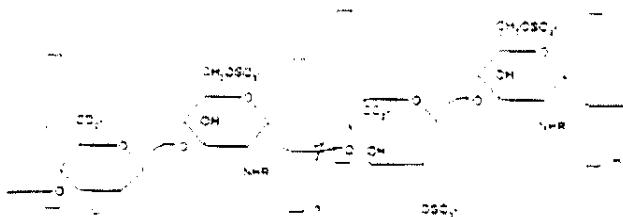
BOHEMIA PATENT, Ing. Jana Vandělíková, Spálená  
97/29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Deriváty částečně desulfatovaných  
glykosaminoglykanů s antiangiogenním  
účinkem a postrádajících antikoagulační účinky**

(57) Anotace:

Jsou popsány částečně desulfatované glykosaminoglykanové deriváty, zvláště sloučeniny obecného vzorce I, kde skupiny U, R a R<sub>1</sub> mají význam uvedený v popisu. Jmenované glykosaminoglykanové deriváty jsou vybaveny antiangiogenními účinky a nemají antikoagulační účinek.



CZ 303030 B6

## Deriváty částečně desulfatovaných glykosaminoglykanů s antiangiogenním účinkem a postrádajících antikoagulační účinky

### 5 Oblast techniky

Zde popisovaný vynález se týká částečně desulfatovaných glykosaminoglykanových derivátů, zvláště heparinů, postupů jejich přípravy a využívání jako aktivních složek k přípravě léčiv s antiangiogenním účinkem, zvláště k léčbě nádorů, jako například metastázových forem a farmaceutických přípravků, které je obsahují.

### Dosavadní stav techniky

15 První látka mající antiangiogenní účinky byla objevena Henry Bremem a Judah Folkmanem v roce 1975. Od tohoto roku bylo objeveno více než 300 nových látek schopných inhibovat angiogenezi.

Na počátku osmdesátých let bylo s objevením interferonu ( $\alpha, \beta$ ) jako inhibitoru nádorové angiogeneze na základě tohoto přístupu započato s klinickými pokusy.

Sdělovací prostředky způsobily rozčeření hladiny, když New York Times 3. března 1998 publikoval dvě látky – angiostatin a endostatin – objevené v laboratořích J. Folkmana na Harvard Medical School a dětské nemocnici v Bostonu, které vedly k velmi povzbudivým výsledkům v zápase proti rakovině. Vysoký stupeň účinnosti těchto dvou látek při inhibici angiogeneze podstatně podpořil vyhledávání nových sloučenin. V současnosti existuje okolo třiceti látek obdařených protinádorovým působením působícími antiangiogenním mechanismem, které vstoupily do fáze klinických zkoušek (fáze I až III), a zabývá se jimi téměř stejný počet společností a institucí.

30 V samotných Spojených Státech je přibližně 9 milionů pacientů, kterým může prospět antiangiogenní terapie. V současnosti bylo zařazeno do klinických zkoušek s využitím této terapie okolo 4000 pacientů, aniž by byly zaznamenány jakékoliv významné nežádoucí účinky.

V rámci obecného pojmu angiogeneze musíme rozlišovat mezi vaskulogenezí, která je tak říkajíc tvorbou krevních cest během embryonálního vývoje a angiogenezí v přísně vymezeném smyslu tohoto slova, což značí tvorbu nových krevních řečišť (kapilár) během postnatálního života, vycházejí z již před tím existujících cest. Důležitost angiogeneze pro růst tuhých nádorů je bohatě zdokumentována. V posledních třech desetiletích se uvádí, že růst nádorů, rovněž tak jako tvorba metastáz, je přísně závislá na vývoji nových krevních cest schopných prokrvovat nádorovou hmotu.

Inhibice angiogeneze je základem pro vytváření nekrotických hmot v nádoru nebo pro indukci apoptosy v nádorových buňkách.

45 Existují jasně rozlišitelné rozdíly mezi neovaskularizací v normální tkáni a v nádorové tkáni. U první představuje vaskulární endothel klidovou tkáň s velmi nízkým mitotickým indexem buněk z ní složených (obnovovací doba měřená ve stovkách dní), a vaskulární síť je pravidelná, poměrně homogenní a vhodná k odpovídající oxidaci celé tkáni, bez jakýchkoliv arteriovenozních spojení. Naopak v nádorové tkáni dává stimulace proliferačních endotheliálních buněk vznik vysokému mitotickému indexu této nádorové tkáni (střední doba obnovy 5 dnů), neovaskularizace je nepravidelná s oblastmi okluze, někdy s uzavřenými zakončeními s arteriovenozními dotyky v některých bodech a nakonec bazální membrána vytvoří mezery, které pak vedou v některých bodech ke tkáňové hypoxii. Tyto rozdíly nabízejí příležitost k určení léčiv, která selektivně blokují nádorovou neovaskularizaci.

55

V nádoru nekoinciduje vždy neovaskularizace s přesným stavem vývoje nádoru; ve skutečnosti existují příklady, ve kterých začne angiogeneze i před vývojem nádoru (například karcinom děložního hrdla), i jiné, ve kterých dvě fáze koincidují (například karcinom měchýře a prsu) a dalších, ve kterých angiogeneze začíná po neoplazmě (například melanom a karcinom vaječnicků; viz například Bonadonna, G., et al., „Manual of Medical Oncology“, IV. vyd., 1991).

Antiangiogenní terapie má v porovnání s tradiční běžnou chemoterapií mnoho výhod (Cancer Research, 58, 1408 až 16, 1998):

- a) specificitu: cílem je proces, tj. neovaskularizace nádoru;
- b) biologickou dostupnost: jejím cílem jsou endoteliální buňky, kterých je možno snadno dosáhnout bez problémů s tradiční chemoterapií, která působí přímo na nádorové buňky;
- c) chemorezistence: toto je patrně nejdůležitější výhoda této terapie; jelikož endoteliální buňky – nepodobné nádorovým buňkám – jsou geneticky stabilní, nevzniká rezistence na léčivo;
- d) metastatické rozvinutí: blokáda neovaskularizace omezuje propagaci nádorových buněk do jiných oblastí těla krevním řečištěm;
- e) apoptóza: blokáda vaskulární sítě v nádoru omezuje přísun kyslíku a živin nádorovým buňkám; apoptóza je za těchto podmínek příznivá;
- f) snížení systémové toxicity: toxické účinky jako je myelosuprese, gastrointestinální účinky a dočasná ztráta vlasů, které nastávají u tradiční chemoterapie téměř pravidelně, nejsou při antiangiogenní terapii pozorovány.

Je známo mnoho látek, které se využívají v nádorové angiogenezi (Oncology, 54, 177 až 84, 1997). O pro- a antiangiogenních endogenních faktorech je známo, že jsou biologickými regulačními mechanismy při vytváření nových krevních cest.

Jako angiogenní stimulatory můžeme zmínit: fibroblastový růstový faktor (FGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), angiogenin, transformující růstový faktor  $\alpha$ , nádorový nekrotický faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), endoteliální růstový faktor odvozený od krevních destiček, transformační růstový faktor  $\beta$ , inhibitor in vitro, ale i in vivo stimulator, placentární růstový faktor, interleukin-8, hepatocytický růstový faktor, růstový faktor odvozený od krevních destiček, granulocytové faktory stimulující kolonie, proliferin, prostaglandiny (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>), GM1-GT1b, látku P, bradykininy a oxid dusičitý.

Mezi angiogenní inhibitory naproti tomu náleží: rozpustný receptor bFGF, interferony ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), angiostatin, thrombospondin-1, prolaktin (16 kDa terminální amino fragment), faktor 4 krevních destiček (PF4), inhibitory tkáňové metalloproteinázy (TIMP), placentární peptid příbuzný proliferinu, angiogenetický inhibiční faktor odvozený od gliomu, angiostatické steroidy, inhibitor odvozený od chrupavky (CDI), heparinázy, interleukin-12, inhibitor aktivátoru plasminogenu, retinoidy, endostatin, angiopoietin-2, genistein, oxid dusičitý a GM3.

Integriny jsou obrovskou skupinou transmembránových proteinů, které zprostředkují interakce mezi buňkami a mezi buňkou a mimobuněčným obsahem. Všechny integriny jsou schopné rozpoznávat obvyklé peptidové sekvence Arg-Gly-Asp („univerzální rozpoznávací poloha buňky“), protože každý integrin přednostně rozpoznává odlišné konformace v tomto tripeptidu. Inhibice specifických subtypů integrinu může být z farmakologického hlediska při vývoji angiogenních inhibitorů velmi zajímavá.

Kontrola proteinkinázy C (PK-C) může také umožnit řízení angiogeneze. Jsou to ve skutečnosti klasické PK-C inhibitory schopné zcela nebo částečně blokovat angiogenezi.

Přes enormní investice a zainteresování mnoha ústavů a soukromých výzkumných středisek, je celosvětový rakovinový problém ještě daleko od konečného řešení. I když se prognóza obětí rakoviny zlepšila, s hodnotou přežití vzrostlou v posledních 30 letech z průměru 30 až 50 %, a genetické, buněčné a biochemické mechanismy působící při vývoji nádoru jsou nyní již dobře známy, je možnost vítězství či alespoň omezení tohoto patologického typu stále vážným problémem pro horlivé koncerny a zbývá ještě mnoho nerozřešených aspektů, jako je pravděpodobnost opětného vzplanutí, dočasného vymizení nemoci a metastatického rozšíření primárního nádoru.

Ke konci sedmdesátých let, když začala mezinárodní vědecká společnost potvrzovat Folkmanova pozorování, byly z přirozených zdrojů izolovány stovky látek obdařených antiangiogenním účinkem (rostliny, houby, biologické tekutiny), rovněž tak jako byly tyto látky syntetizovány v laboratořích.

Ve fázi III je nyní velký počet léčiv, jako je například Marimastat (British Biotech.), I'AG3340 (Prinomast-Agouron), a Neovastat (Aeterna), všechny působící hlavně v pulmonární oblasti (SNCL) mechanismem představujícím interferenci s metalloproteinázami. Ve fázi III je také RhuMad VEGF (to je protilátka anti-VEGF od Genetech) a interferon  $\alpha$  (komerční), které jsou účinné proti tuhým nádorům díky jejich interferenci s pro-angiogenními růstovými faktory nebo TNP-470 (TAP Pharm.), který působí přímo na endotheliální buňky. Konečně taková léčiva jako je CAI (NCI) a IM862 (Cytran) jsou účinná jako antiangiogenní látky, avšak nejsou specifická a jejich mechanismus je jen velmi málo známý.

Tato výše uvedená léčiva se mohou v několika letech stát součástí onkologické terapeutické výzbroje, avšak jsou i další látky, které se dostávají do klinických zkoušek fáze I/II, jako je Combretastation (OxiGene), methoxyestradiol a endostatin (EntreMed), které jsou na základě předběžných klinických studií velmi slibné. Společnosti jako je Bristol Myers-Squibb (s BMS-275291), Novartis (s CGS27023A) nebo Parke-Davis (se Suraminem) se touto terapeutickou strategií zabývají.

Heparin

Heparin je heterogenní směs přirozeně se nacházejících polysacharidů různé délky a různého stupně sulfatace, která má antikoagulační účinky a je vylučována spojovací tkání žírných buněk, které jsou v játrech (ze kterých byla poprvé izolována), ve svalech, plicích, thymu a slezině.

Vedle pravidelné sekvence byla v heparinu identifikována sekvence odpovídající aktivní poloze pro antithrombinové účinky.

Protinádorové a antimetastatické účinky heparinu a jeho derivátů nastávají pro jeho schopnost inhibovat heparinázu a blokovat růstové faktory a řídit angiogenezi.

Sírany heparanu (HS)

Sírany heparanu (HS) jsou všudypřítomné proteinové ligandy. Proteiny se váží na řetězce HS za rozličnými účely od jednoduché imobilizace nebo ochraně proti proteolytickým degradačním účinkům na specifické modulace biologických účinků, jako je angiogeneze.

Kostra cukrů jak v heparinu, tak v síranech heparanu (HS) se skládá z alternace D-glukosaminu (GlcN) a kyseliny hexuronové (Glc.A nebo IdO.A).

U heparinu jsou zbytky GlcN hlavně N-sulfatované, zatímco v HS jsou jak N-sulfatované, tak N-acetylované s malým množstvím nesubstituovaného N-.

HS je také v průměru méně O-sulfatovaný než heparin.

Využití heparinu k léčbě poruch takové angiogeneze jako jsou nádory a zvláště metastázy je v podstatě omezeno na antikoagulační účinky heparinu.

- 5 Byly vyrobeny chemické modifikace heparinu, takové, aby se omezila jeho antikoagulační kapacita, a současně se zachovaly jeho protinádorové vlastnosti.

Otevření jednotky kyseliny glukuronové v antithrombinové poloze omezí affinitu heparinu k antithrombinu: touto cestou lze využívat hepariny s omezeným antikoagulačním účinkem, které si však ještě zachovávají antiangiogenní vlastnosti.

#### Heparanázy

15 „Heparanázy“ jsou enzymy náležející do skupiny endoglykosidáz, které hydrolyzují vnitřní glykosidové vazby řetězce síranů heparanu (HS) a heparinu.

Tyto endoglykosidázy se uplatňují při proliferaci nádorových buněk, při metastázách a při neovaskularizaci nádorů. To inspiruje k tomu, že se mohou také podílet se na angiogenezi nádorů jako důsledek uvolnění z mimobuněčné hmoty růstových faktorů vázaných na heparin, jako je aFGF (též nazývaný FGF-1), bFGF (též nazývaný FGF-2) a VEGF.

Tyto enzymy jsou biologickými cíly pro antiangiogenní působení. Ve vědecké literatuře je velký počet strukturních a srovnávacích studií účinků (viz na příklad Lapierra, F., et al., *Glycobiology*, 6, (3), 355 až 366, 1996). I když mnoho stránek ještě čeká na vyjasnění, objevují se studie týkající se inhibice heparanáz heparinem a jeho deriváty používající zkoušky, které vedou k úvahám o strukturálních typech, které mohou sloužit jako vodítka k získání nových selektivnějších derivátů.

Ve výše zmíněné práci Lapierra et al., jsou popisovány deriváty heparinu získané 2-O desulfatací nebo „rozštěpením glykolu“ (oxidace jodistanem a následnou redukcí borohydridem sodným). Tyto deriváty zde definované jako „2-O-desulfátovaný heparin“ a „RO-heparin“ si částečně udržují antiangiogenní účinek heparinu, jak to bylo potvrzeno zkouškou CAM v přítomnosti kortikosteroidů, jak to je uvedeno v tabulce III (ibid., str. 360).

#### Hepariny a FGF

35 FGF řídí mnohé fyziologické procesy, jako je růst buněk a jejich diferenciaci, ale také funkce týkající se patologických procesů, jako je angiogeneze nádorů.

40 FGF jsou růstovými faktory (skupina více než 10 polypeptidů, z nichž kyselý FGF (FGF-1) a bazický FGF (FGF-2) jsou jedněmi, které byly nejvíce prostudovány, a které vyžadují polysacharidový kofaktor, heparin nebo HS, aby se vážaly na receptor FGF (FGFR) a aktivovaly ho.

I když je přesný mechanismus, kterým heparin a HS aktivují FGF neznámý, přesto se ví, že heparin/FGF/FGFR vytváří „trímolekulový“ nebo „ternární“ komplex.

45 Jedním z postulovaných mechanismů je ten, že heparin a HS indukují tak zvanou sendvičovou dimerizaci FGF a tato takto dimerizovaná látka vytvoří stabilní komplex s FGFR.

#### Antimetastatické účinky heparinových derivátů

50 Schopnost primárního nádoru vytvářet metastatické buňky je patrně hlavním problémem, kterému čelí protinádorová terapie.

55 Zdá se, že heparinové deriváty se zvláštní schopností blokovat heparanázu jsou stejně tak schopné inhibovat angiogenezi jak primárních nádorů, tak metastáz.

Inhibice heparanázy navíc omezuje schopnost nádorových buněk migrovat z primárního nádoru do jiných orgánů.

- 5 Následující tabulka podává příklady vztahů strukturních a antimetastatických účinků v případě heparinu:

	% inhibice
heparin	97
N-sukcinylheparin	60
N-sukcinyl-RO-heparin	58
nízkomolekulární heparin	86
nízkomolekulární N-sukcinylheparin	61
heparin s velmi nízkou m.hm.	83

m.hm = molekulová hmotnost

- 10 Hodnoty v této tabulce ukazují, že velmi krátké fragmenty heparinu jsou stále vybaveny dobrými antimetastatickými účinky, zatímco se tyto účinky zmenšují, pokud je aminová skupina glukosaminu vázaná na kyselinu jantarovou.

15 Strukturálně se molekuly podobné heparinu podle účinku inhibujícího angiogenezi řadí do dvou kategorií na základě cíle, který se chce blokovat:

- 20 a) blokáda heparanázy – enzymu, který hydrolyzuje glykosidové vazby síranů heparanu za uvolnění růstových faktorů. Sloučeniny podobné heparinu přednostně sestávají za sekvencí alespoň osmi monosacharidových jednotek obsahujících kyselinu N-acetylglukosamin-glukuronovou (nebo N-sulfatovaný glukosamin – viz například Sandback-Pikas, D., et al., J. Biol. Chem., 273, 18777 až 18780, 1998 a citované odkazy).
- 25 b) blokáda angiogenního růstového faktoru (fibroblastový typ: FGF-1 a FGF-2; typ vaskulárního endothelia: VEGF; typ vaskulární permeability: VPPF).

Sloučeniny podobné heparinu mají sekvence dlouhé alespoň pět monosacharidových jednotek a obsahují 2-sulfatovanou kyselinu iduronovou a N-6-sulfatovaný glukosamin (viz například Maccarana, M., et al., J. Biol. Chem., 268, 23989 až 23905, 1993).

30 V literatuře jsou popsány malé peptidy (5 až 13 aminokyselin) s antiangiogenními účinky (patent US 5 399 667 z University of Washington), které působí vazbou na thrombospondinový receptor nebo další peptidy (přibližně 50 aminokyselin)-

35 Jsou známy modifikované faktory krevních destiček – (EP 0 589 719, Lilli) schopné inhibovat endotheliální proliferaci, s  $IC_{50} = 7$  nM.

Též byly popsány oligosacharidové fragmenty s antiangiogenními účinky: bylo zjištěno, že měněním sekvence cukrů lze zvýšit interakční selektivitu.

5 Heparin může být navíc použit jako vehikulum pro látky, které jsou samy antiangiogenní, jako jsou například steroidy, rozvíjející affinitu heparinu na vaskulární endotheliální buňky; viz například WO 93/18 793 z University of Texas a Imperial Cancer Research Technology, kde jsou nárokovány hepariny, s vazebnými jednotkami labilními v kyselém prostředí, jako jsou hydrazin kyseliny adipové vázaný na kortisol. Antiangiogenní účinek konjugovaných molekul je větší než  
10 nekonjugovaných molekul, a to i když jsou podávány souběžně.

V Biochim. Biophys. Acta, 1310, 86 až 96, 1996 jsou popsány hepariny vázané na steroidy (např. kortisol) s hydrazonovou skupinou na C-20, které mají větší antiangiogenní účinky, než obě  
15 nekonjugované látky.

EP 0 246 654 od Daiichi Sc. popisuje sulfatované polysacharidy s antiangiogenními účinky, které jsou ve studijní fázi II.

EP 0 394 971 od Pharmacia & Upjohn – Harvard Coll. popisuje hexasacharidy – heparinové  
20 fragmenty – s nízkou sulfatací, schopné inhibovat růst endotheliálních buněk a angiogenezi stimulovanou FGF-1.

EP 0 618 234 od Alfa Wasserman popisuje způsob přípravy polosyntetických glykosaminoglykanů s heparinovou nebo heparanovou strukturou nesoucí nukleofilní skupinu.  
25

WO 95/05 182 od Glycomed popisuje různé sulfatované oligosacharidy s antikoagulačními, antiangiogenními a protizánětlivými účinky.

Patent US 5 808 021 od Glycomed popisuje způsob přípravy v podstatě nedepolymerovaného 2-O, 3-O desulfatovaného heparinu s procentuální desulfatací kyseliny iduronové v poloze 2- (1, 2-O) a v poloze 3 glukosaminové jednotky (A, 3-O) sahající přibližně od 99 do přibližně 75 %  
30 původního obsahu. Tento způsob počítá s desulfatací prováděnou v přítomnosti kationtu dvojmocného kovu představovaného vápníkem nebo mědí, následovanou lyofilizací získaného produktu. Desulfatované hepariny mají antiangiogenní účinky.

Požadavkem vynálezu zde popisovaného je nalezení optimálních glykosaminoglykanových struktur k získání antiangiogenních účinků založených na inhibici heparanázy a/nebo mechanismus inhibice růstového faktoru FGF. Dalším cílem zde popisovaného vynálezu je opatřit léčivo s antiangiogenními účinky, které zcela postrádá typické vedlejší účinky heparinových derivátů,  
40 jako je například antikoagulační účinek.

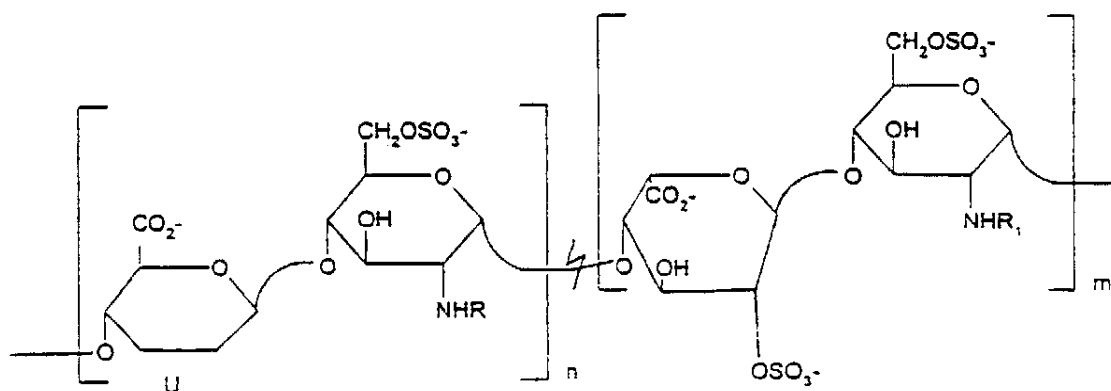
#### Podstata vynálezu

45 Nyní bylo zjištěno, že podrobením takového glykosaminoglykanu jako například glykosaminoglykanu podobnému heparinu, heparinu či modifikovanému heparinu obsahujícímu glukosaminové zbytky v různém stupni N-desulfatace a případně následně celkové nebo částečné N-acetylace, se řízenou 2-O-desulfatací iduronových jednotek až do stupně desulfatace ne vyššího než 60 % z celkového počtu uronových jednotek, udrží vazebné vlastnosti angiogenního růstového  
50 faktoru. Desulfatovaný 2-O heparin, který nemá celkově více než 60 % uronových jednotek je překvapivě značně antiangiogenní.

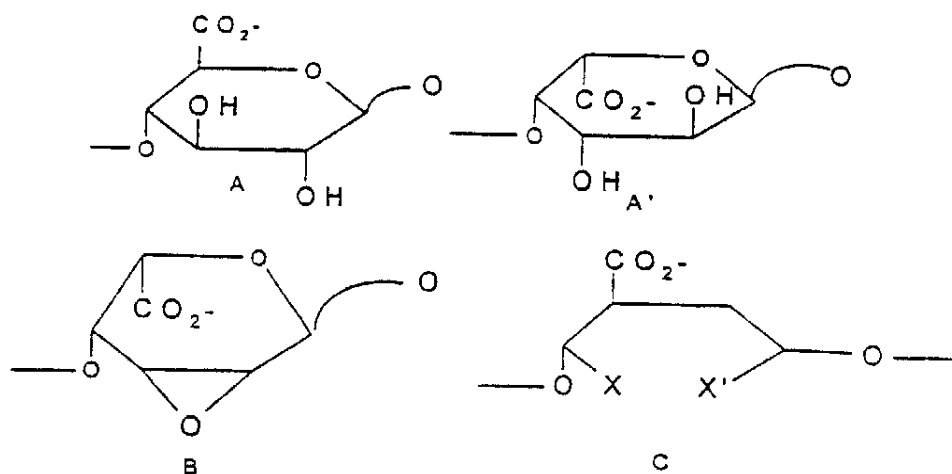
Desulfatace prováděná za podmínek popisovaných v předloženém vynálezu také vytváří iduronové jednotky s oxyranovým kruhem v poloze 2,3. Otevření oxyranového kruhu za podmínek  
55 popsanych v předloženém vynálezu dá vznik L-iduronovým nebo L-galakturonovým jednotkám.

Předmětem zde popisovaného vynálezu je glykosaminoglykanový derivát, zvláště desulfatovaný heparin, selektivně částečně desulfatovaný se stupněm desulfatace ne vyšším než 60 % z celkových uronových jednotek; tato desulfatační přerušení zmenšují délku pravidelných sekvencí utvářených řazením disacharidových trisulfatovaných jednotek.

Pro jednoho z řešení zde popisovaný vynález uvádí obecný vzorec sloučeniny I



kde může mít kruh U tyto významy:



X a X', které mohou být stejné nebo různé jsou aldehydové skupiny nebo skupina  $-\text{CH}_2-\text{D}$ , kde D je hydroxyl nebo aminokyselina, peptid nebo zbytek cukru nebo oligosacharid;

R a R<sub>1</sub>, které mohou být stejné nebo různé, jsou SO<sub>3</sub> nebo acetylový zbytek;

n a m, které mohou být stejné nebo různé se mohou měnit od 1 do 40;

součet  $n + m$  se pohybuje od 6 do 40; poměr  $n : m$  se pohybuje od 10 : 2 do 1 : 1. Přednost se dává tomu, aby bylo m větší nebo rovno n. n se přednostně pohybuje v rozmezí od 40 do 60 %

součtu  $m + n$ . Symbol  $\text{---}$  značí, že jednotky označené m a n jsou statisticky rozděleny podél polysacharidového řetězce a nenásledují nutně za sebou.

Sloučeniny, které jsou předmětem zde popisovaného vynálezu mají zajímavé antiangiogenní vlastnosti a jsou tedy vhodné jako účinné složky k přípravě léčiv k léčbě patologických stavů založených na abnormální angiogenezi a zvláště k léčbě metastáz.

5 Sloučeniny podle vynálezu mají výhodně snížené, pokud ne zcela žádné antikoagulační vlastnosti, čímž se předchází či omezují vedlejší účinky typické pro heparin. Další výhoda vychází se skutečností, že sloučeniny podle vynálezu mohou být charakterizovány instrumentálními analytickými technikami jako je NMR spektroskopie, a tím umožňují kontrolu, která je z průmyslového hlediska nutně vyžadována.

10

Také v případě modifikovaných heparinů má molekulová hmotnost (m.hm.) při výrobě angiogenních inhibitorů velmi důležitou funkci. Je dobře znám, že snížení molekulové hmotnosti (m.hm.) na hodnoty odpovídající pentasacharidovým jednotkám nevedou ke ztrátě antiangiogenních účinků. Na druhé straně bylo zjištěno, že vedle toho při určité délce inklinují heparinové řetězce spíše k dimerizaci a tím i k aktivaci FGF.

15

#### Podrobný popis vynálezu

20 Desulfatačním stupněm je míněno procento nesulfatovaných kyselin iduronových vztažené na celkový obsah kyselin uronových původně ve výchozím heparinu obsažených. Jedna z počátečních oblastí procentuálního stupně desulfatace se pohybuje přibližně od 40 do přibližně 60 %. Mezi sloučeninami obecného vzorce (I) se dává přednost sloučenině:

25 heparinu částečně 2-O-desulfatovanému s molekulovou hmotností (m.hm.) 11200, polydisperzním indexem D rovným 1,3, desulfatačním stupněm 1,99 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^-$  :  $\text{COO}^-$ ), procentem modifikovaných kyselin uronových vztaženo na celkové kyseliny uronové přibližně 50 % (zde též nazývanému ST1514). Jmenovaná sloučeniny je obsažena v obecném vzorci I, kde vedle dalších odpovídajících definic má  $m : n = 1 : 1$  a jednotky označené m a n jsou rozděleny podél polysacharidového řetězce s pravidelným se střídáním.

30

Sloučeniny podle zde popisovaného vynálezu jsou připravovány postupem obsahujícím:

- 35 a) základní zpracování při teplotě pohybující se od okolní teploty přibližně do 100 °C, přednostně od 50 do 70 °C, a ještě lépe přibližně kolem 65 °C, což vede k řízené eliminaci obsahu sulfátových skupin v poloze 2 kyseliny iduronové a k tvorbě epoxidových skupin; a pokud je potřeba
- 40 b) otevření epoxidového kruhu přibližně při pH 7 za teploty pohybující se v rozsahu přibližně od 50 °C přibližně do 100 °C, lépe však přibližně kolem 70 °C, což vede ke zbytkům kyseliny galakturonové; nebo alternativně
- 45 c) otevření jmenovaného epoxidového kruhu při teplotě pohybující se přibližně od 0 do 30 °C, lépe přibližně kolem 25 °C za vzniku zbytků kyseliny iduronové; a pokud je třeba
- 50 d) oxidaci diolů jodistanem sodným, což vede k otevření glykosidového kruhu a vytvoření dvou aldehydových skupin na jeden modifikovaný zbytek;
- e) redukci jmenovaných aldehydových skupin na primární alkohol a pokud to je potřeba, transformaci skupiny D na skupinu jinou než hydroxyl, jak se s tím počítá ve významu obecného vzorce I;
- 55 f) případnou kyselou hydrolyzu k získání oligosacharidů majících pravidelné sekvence, či alternativně

- g) částečnou enzymatickou hydrolyzou enzymem vybraným ze skupiny sestávající z lyázy, heparinázy, heparitinázy nebo ekvivalentní látky získané ve stupni e), aby vedly k získání oligosacharidů, přednostně tetra- nebo oktasacharidů, s neredukujícím koncovým zbytkem obsahujícím nenasycenou kyselinu iduronovou, kde redukující zbytek sestává z N-sulfo-glukosaminu a obsahuje alespoň jeden zbytek otevřené kyseliny iduronové; nebo alternativně
- h) sloučenina získaná ve stupni a) nebo produkt získaný ve stupni b) se částečně enzymaticky hydrolyzuje; a pokud je potřeba
- i) produkty se podrobí jednomu z kroků a), b) a e) k částečné 6-O-desulfataci; nebo alternativně
- j) výchozí heparin se podrobí částečně nebo úplně 6-desulfataci v krocích a), b) a e).

Podle zde popisovaného vynálezu je další sloučeninou, které se dává přednost:

heparin částečně 2-O-desulfatovaný, který lze získat postupem popsaným výše, kde se stupeň a) provádí po dobu 45 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7, mající molekulovou hmotnost (m.hm.) 11200, polydisperzní index D rovný 1,3, desulfatační stupeň 1,99 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^- : \text{COO}^-$ ), procento modifikovaných kyselin uronových vztažený na celkové kyseliny uronové přibližně 50 % (zde též nazývaný ST1514).

Molekulová hmotnost se stanoví HPLC-GPC (vysokotlaká kapalinová chromatografie – gelová permeační chromatografie). Stupeň desulfatace se stanoví konduktometricky a procento modifikovaných kyselin uronových  $^{13}\text{C}$ -NMR.

m.hm. je molekulová hmotnost a D je polydisperzní index vyjádřený jako m.hm./Mn.

Podle zde popisovaného vynálezu jsou výchozími produkty glykosaminoglykany různého původu, přednostně přirozeně se nacházející hepariny. Také je možno používat chemicky upravené hepariny s procentuálním obsahem N,6 disulfátu pohybující se v oblasti od 0 do 100 %. Při zahájení z produktu s různým obsahem 6-O-sulfátovaného glukosaminu je možné upravovat délku pravidelných sekvencí mezi jednou otevřenou kyselinou iduronovou a dalšími. Glykosaminoglykany podle vynálezu, u kterých se otevře glykosidový kruh se obvykle odborníky nazývají RO deriváty, čímž je míněno, že glykosidový kruh byl otevřen oxidačním postupem, po němž následovala redukce (Redukce – Oxidace – RO). Toto otevření glykosidového kruhu se také podle konvence nazývá „rozštěpení glykolu“, protože na otevřeném kruhu jsou vytvořeny dva primární hydroxyly. Sloučeniny na které se zde odkazuje budou tedy také nazývány deriváty „RO“ nebo „s rozštěpeným glykolem“.

U dalšího řešení podle zde předloženého vynálezu si aldehydy a primární hydroxidy odvozené z výše popsané reakce („s rozštěpeným glykolem“) vytvářejí funkční skupiny. Sloučeniny obecného vzorce I mohou tedy také na primárních hydroxylech nést stejné nebo různé skupiny odvozené od rozštěpeného glykolu tak, jak to je definováno výše pro X a X', například oligosacharidové nebo peptidové skupiny počínaje od jediného sacharidu nebo aminokyseliny k délce více než jedné jednotky, nejlépe 2 či 3 jednotkám.

Sloučeniny obecného vzorce I, kde X a X' jsou  $-\text{CH}_2\text{OH}$  mohou být také použity jako vehikuly pro jiné typy léčiv, a to vhodnou vazbou na tu část heparinu, která je schopná zajistit pevnou vazbu za běžných podmínek výroby a skladování, která se však uvolní při transportu léčiva v těle, přednostně pak v blízkosti cílového orgánu. Příklady takových látek, které mohou být transportovány jsou steroidní i nesteroidní protizánětlivé látky, kortikosteroidy a další látky s antimetastatickými účinky, což je výhodným vylepšením antimetastatického účinku jakožto výsledku součtu jednotlivých reálných účinků sloučenin podle vynálezu a antimetastatické vazby látky na ně,

s poměrnou výhodou větší cílové selektivity a nižší systémovou toxicitou. Příklady takových látek jsou metalloproteinázové inhibitory. Další látky, které mohou být dobře transportovány jsou ty, které působí na endotelální úrovni. Sloučeniny obecného vzorce I, kde X a X' jsou jiné než hydroxyl nebo aldehyd lze také použít jako vehikulum, látek, a v tom případě skupiny X a X' působí jako „vločky“ mezi transportovanou molekulou, kterou je glykosaminoglykan podle předloženého vynálezu a molekulou působící jako vehikulum, a takové případy lze doporučit jako farmakokinetika nebo farmakodynamika.

V případě sloučenin podle vynálezu odvozených od heparinu se tyto látky připravují ze samotného výchozího heparinu desulfatační technologií technickým odborníkům z oboru známou. Desulfatace se například provádí v přítomnosti alkalických činidel jako je hydroxid sodný, při teplotách sahajících od okolní teploty po 100 °C, lépe však od 50 do 70 °C, například při 60 °C po dostatečně dlouhou dobu, aby se dosáhlo požadované desulfatace. Desulfatace se reguluje řízením parametrů výroby, jako například koncentracemi reakčních látek, teplotou a reakční dobou. Jeden z příkladů spočívá v udržování konstantní koncentrace substrátu (glykosaminoglykanu) na hodnotě 80 mg.ml<sup>-1</sup> a NaOH na hodnotě 1 M, konstantní teplotě 60 °C a desulfatace se řídí reakční dobou od 15 do 60 minut. Odborníci z oboru mohou měnit podmínky, například zvýšit reakční teplotu a zkrátit reakční dobu na základě běžné zkoušky a na základě jejich obecných znalostí věci.

Působení alkalickými činidly vznikají meziproducty charakterizované přítomností epoxidového kruhu na desulfatované jednotce. U těchto meziproductů se překvapivě prokázalo, že jsou vybaveny antiangiogenními vlastnostmi podobnými těm, jaké mají sloučeniny obecného vzorce I. Dalším předmětem zde popisovaného vynálezu je proto derivát částečně desulfatovaného heparinu – tedy heparin s redukováným nábojem – zvláště heparin částečně desulfatovaný, a to ne více než na 60 %, charakterizovaný epoxidovým kruhem v desulfatační poloze. Jmenované sloučeniny charakterizované epoxidovým kruhem náležejí také k předmětu, který předložený vynález zahrnuje, takže jde tak říkajíc o farmaceutický přípravek, který je obsahuje a dalším předmětem je jejich využití k přípravě léčiv s antiangiogenními účinky.

Přednost se dává těmto sloučeninám:

heparinu částečně 2-O-desulfatovanému s molekulovou hmotností (m.hm.) 11900, polydisperzním indexem D rovným 1,5, desulfatačním stupněm 2,05 (vyjádřeno jako molární poměr SO<sub>3</sub><sup>-</sup> : COO<sup>-</sup>), procentem modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovanych uronových zbytků (zde též nazývanému ST1513);

heparinu částečně 2-O-desulfatovanému s molekulovou hmotností (m.hm.) 11000, polydisperzním indexem D rovným 1,5, desulfatačním stupněm 2,05 (vyjádřeno jako molární poměr SO<sub>3</sub><sup>-</sup> : COO<sup>-</sup>), procentem modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovanych uronových zbytků;

heparinu částečně 2-O-desulfatovanému s molekulovou hmotností (m.hm.) 9200, polydisperzním indexem D rovným 1,5, desulfatačním stupněm 2,05 (vyjádřeno jako molární poměr SO<sub>3</sub><sup>-</sup> : COO<sup>-</sup>), procentem modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 11 % epoxidových skupin, 27,5 % oxidovaných a redukovanych uronových zbytků.

V jednom z možných řešení zde popisovaného vynálezu se dává přednost:

heparinu částečně 2-O-desulfatovanému, který lze získat postupem popsáním výše, kde se stupeň a) provádí po dobu 15 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7, majícímu molekulovou hmotnost (m.hm.) 12900, polydisperzní index D rovný 1,5, desulfatační stupeň 2,05 (vyjádřeno jako molární poměr SO<sub>3</sub><sup>-</sup> : COO<sup>-</sup>), procento modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na

celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovaných uronových zbytků (zde též nazývanému ST1513);

5 heparinu částečně 2-O-desulfatovanému, který lze získat postupem popsaným výše, kde se stupeň a) provádí po dobu 30 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7, (zde nazývanému ST1516) majícímu molekulovou hmotnost (m.hm.) 11000, polydisperzní index D rovný 1,5, desulfatační stupeň 1,8 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^- : \text{COO}^-$ ), procento modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovaných uronových zbytků;

10 heparinu částečně 2-O-desulfatovanému, který lze získat postupem popsaným výše, kde se stupeň a) provádí po dobu 60 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7, majícímu molekulovou hmotnost (m.hm.) 9200, polydisperzní index D rovný 1,5, procento modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 11 % epoxidových skupin, 27,5 % oxidovaných a redukovaných (rozštěpených) uronových zbytků (zde nazývanému ST1515).

Po vytvoření epoxidového kruhu se tento otevře, a opět roztrídí známými technologiemi. Procento vytvořeného epoxidu se počítá z poměru mezi plochou signálu  $^{13}\text{C}$ -NMR přibližně při 55 ppm, charakterizovaného uhlíky 2 a 3 na kruhu kyseliny uronové obsahující epoxid a celkovým počtem anomerických signálů (C1 glukosaminu a zbytků kyseliny galakturonové, zatímco pokud se provádí otevření epoxidového kruhu za studena, získá se zbytek kyseliny iduronové. Příklady sloučenin obsahující epoxidový kruh, kterým se dává přednost lze získat postupem popsaným výše s obsahem epoxidované kyseliny uronové 14 % (zde ST1509), 24 % (zde ST1525) a 30 % (zde ST1526).

25 Částečně desulfatovaný heparin se potom podrobí „glykolovému štěpení (RO nakrátko) postupem výše definovaným a Smithově degradaci (SD nakrátko).

30 Sloučeniny obecného vzorce I lze také získat bez průchodu přes epoxidový meziprodukt, což se provádí přímým rozštěpením na glykol a následnou Smithovou degradací.

Takto popsaný postup vede ke sloučeninám obecného vzorce I, ve kterých jsou obě skupiny X a X'-CH<sub>2</sub>OH.

35 Pro jiné X a X' jiné než -CH<sub>2</sub>OH jsou pro transformaci hydroxylové skupiny jinými skupinami, se kterými se počítá ve výše uvedených definicích, k dispozici metody odborníkům z oboru dostupné. Konjugaci s aminokyselinami nebo peptidy lze například provádět reduktivní aminační reakcí aldehydového meziproduktu ze štěpné glykolové reakce (Hoffmann, J., et al., Carbohydrate Research, 117, 328 až 331, 1983), která může být prováděna ve vodném rozpouštědle a je kompatibilní s udržením heparinové struktury.

40 Pokud se to vyžaduje, a to je dalším předmětem zde popisovaného vynálezu, mohou být sloučeniny obecného vzorce I dále degradovány kyselými činidly za vhodného pH, např. při pH 4, což vede ke směsi oligosacharidů, které si podržují antiangiogenní vlastnosti.

45 Stejně tak jsou předmětem předloženého vynálezu sloučeniny získané jedním z kroků g), h), i) a j) podle postupu popsaného výše.

50 Předmětem zde popisovaného vynálezu jsou farmaceutické přípravky obsahující jako účinnou složku alespoň jednu samotnou sloučeninu obecného vzorce I nebo tuto sloučeninu v kombinaci s jednou nebo více sloučeninami obecného vzorce I, nebo jmenovanou sloučeninu nebo sloučeniny obecného vzorce I, nebo jmenovanou sloučeninu nebo sloučeniny obecného vzorce I v kombinaci s desulfatovanými hepariny popsanými výše, např. epoxidovanými meziprodukty; tyto naposledy jmenované látky mohou být použity ve farmaceutických přípravcích samostatně jako účinné složky. Účinná složka podle předloženého vynálezu bude ve směsi s vhodnými vehi-

kuly a/nebo excipienty obvykle používanými ve farmaceutické technologii, jako například látkami popsány v „Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook“, poslední vydání. Přípravky podle předloženého vynálezu budou obsahovat terapeuticky účinné množství účinné složky. Dávky budou stanoveny odborníkem, např. klinickým či praktickým lékařem podle typu onemocnění, které se má léčit a pacientova stavu, nebo podle současného podávání dalších aktivních složek. Příkladné dávky se mohou pohybovat od 0,1 do 100 mg.kg<sup>-1</sup>.

Příklady farmaceutických přípravků jsou takové přípravky, které mohou být podávány orálně nebo parenterálně, intravenózně, intramuskulárně, subkutánně, transdermálně nebo ve formě nosních nebo ústních sprejů. Farmaceutické přípravky vhodné pro tento účel jsou tablety, tvrdé nebo měkké tobolky, prášky, roztoky, suspenze, sirupy a tuhé formy pro narychlo připravované kapalné preparáty. Přípravky pro parenterální podávání jsou například všechny intramuskulární, intravenózní a subkutánní injekční formy, rovněž tak jako roztoky, suspenze a emulze. Také lze zmínit liposomové přípravky. Mezi tablety patří také ty formy, které kontrolovatelně uvolňují účinnou složku, a to ať už ve formě pro orální podávání, tablety potahované vhodnou vrstvou, mikrokapslované prášky, komplexy s cyklodextriny, depotní formy, například subkutánní formy, jako jsou depotní injekce nebo implantáty.

Sloučeniny podle zde popisovaného vynálezu mají antiangiogenní účinky. To je činí vhodnými k přípravě léčiv vhodných k léčbě objektů, obecně savců a zvláště lidí trpících pozmeněnou angiogenezí. Příklady onemocnění léčených takovým léčivem, které je předmětem předloženého vynálezu jsou předně nádory, metastázy, diabetické retinopatie, psoriáza, retrolentikulární fibroplazie, restenóza po angioplastice a koronárním by-passu.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mají výhodu v tom, že v zásadě postrádají vedlejší účinky typické pro heparin. Sloučeniny podle předloženého vynálezu postrádají zvláště anti-koagulační účinky. Tím, že takové účinky postrádají, nemají podle odborníků z pohledu klinického využití žádné nebo jen nepatrné překážky.

Jeden z prvních zjištěných růstových faktorů, který má angiogenní úlohu byl bFGF (nebo FGF-2) následovaný brzy nato aFGF (nebo FGF-1) (rešerše k tomuto předmětu viz Christofori, Oxford University, 1996).

Oba proteiny jsou členy třídy růstových faktorů charakterizovaných vysokým stupněm affinity k heparinu.

Jinými silnými induktory jsou VEGF, VEGF-B a VEGF-C. Všechny tři faktory VEGF podobně jako FGF jsou vždy v těle přítomné. Oba typy těchto faktorů – a/bFGF (FGF-1 a FGF-2) a VEGF – váží specifické vysoce affinitní receptory s transmembránovou doménou mající tyrosinkinázové účinky. Tři receptory VEGF – VEGF-1 (flt-1), VEGF-2 (kdr/flk-1) a VEGF-3 (flt-4) – jsou specificky přítomny na endoteliálních buňkách, zatímco čtyři FGF receptory jsou přítomny v mnohých orgánech a tkáních (rešerše na tento předmět viz Risau a Flame, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 11, 73 až 91, 1995). Vazba bFGF na heparin nebo fragmenty heparan sulfátu způsobují jejich dimerizaci a možnost vazby na jejich vlastní receptor aktivací transdukčních cest signálu, který aktivuje endoteliální buňky jak na mitogenezi, tak na diferenciaci.

Inhibice vazby FGF na heparin nebo na fragmenty heparan sulfátu tak představuje reálný terapeutický cíl v boji proti patologické neoangiogenezi vyvolané zvýšením lokální nebo systémové úrovně růstových faktorů.

Takto navržený model je schopný hodnotit in vitro interferenci různých heparinových derivátů s vazbou bFGF na jeho vlastní receptor.

Byly použity obzvláště vaječnickové buňky čínských křečků (CHO-K1), které mají na svém povrchu heparan sulfát, avšak nemají receptor FGF 1. Také byly použity buňky CHO-745flg,

5 které vylučovaly receptor FGF 1, avšak které oproti předchozím skupinám neměly membránové heparan sulfáty. Tyto naposled jmenované buňky byly trvale v zeleném fluorescenčním světle ovlivněny cDNK kvůli zeleně fluoreskujícímu proteinu, a z tohoto důvodu nemohly být pod fluorescenčním mikroskopem s kombinací filtrů detekovány v zeleném záření. V krátkosti: technika je založena na té možnosti, že dva typy buněk mohou interagovat (vytvářet trvalé vazby) pouze pokud se FGF přidá ke dvěma typům buněk. Ve skutečnosti se budou v tomto případě heparan sulfáty buněk CHO-745flg vázat na FGF, který bude naopak vázat na buňky CHO-K1 a vytvářet tak můstek. Vazbu, která vznikne, je možno detekovat jakožto důsledek zelené fluorescence emitované buňkami CHO-745flg.

10 Sloučeniny byly navíc zkoušeny na jejich inhibiční účinky proliferace buněk. Jedním z hlavních účinků FGF je stimulace růstu buněk v nepřítomnosti séra v buňkách vylučujících FGF receptor 1 (FGFR-1).

15 Dosud byly použity dvě buněčné linie, u kterých se očekávaly inhibiční účinky – obě vylučující FGFR-1 (L6WT1 a bovinní buňky aorty) – jejichž růst byl hodnocen v přítomnosti FGF buď s přidavkem heparinových derivátů, nebo bez nich.

Inhibice FGF-2 zprostředkovaná mezibuněčnou adhezí

20 Buňky CHO-K1 byly naočkovány na 24 jamkové plotny v koncentraci 90000 buněk na  $\text{cm}^2$ . Po 24 hodinách byly buňky zafixovány 3% glutaraldehydem v PBS po dobu 2 hodin při 4 °C a promyty 0,1M glycinem v PBS.

25 Na tyto zafixované monovrstvy byly naočkovány CHO 745 / flg buňky. Před očkováním byly tyto buňky upraveny FGFR-1.

30 Operace očkování se provádí suspenzí upravených CHO 745/flg buněk v DMEM o koncentraci 50 000 buněk/  $\text{cm}^2$ . Suspenzní médium (DMEM) obsahuje 10mM EDTA, 30ng/ml FGF-2 a zvyšující se dávky zkoumaných sloučenin (heparin, RO heparin a sloučeniny nárokové podle vynálezu).

35 Po 2 hodinách inkubace při 37 °C byly počítány navázané buňky pod mikroskopem v inverzi. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento počtu přilnutých buněk v porovnání s měřením v nepřítomnosti zkoušených sloučenin. Sloučeniny byly zkoušeny trojmo při 6 koncentracích sahajících od 1  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  do 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a pro každou sloučeninu byl počítán  $\text{ID}_{50}$  (tabulka 1).

Tabulka I

Inhibice mezibuněčné adheze ( $ID_{50}$ ) buněk CHO-K1 a CHO-745flg

5

Produkt	Inhibice ( $ID_{50}$ )
heparin	100
RO heparin	8
ST1513	80
ST1516	110
ST1514	105
ST1515	120
ST1525	50
ST1528	75
ST1507	125

Inhibice syntézy DNK v buňkách L6 ovlivněných FGFR-1

- 10 Buňky L6-WT1 (krysí myoblasty ovlivněné FGFR-1) byly naočkovány na 48 jamkové plotny v koncentraci 25000 buněk na  $cm^2$  v DMEM + 10 % FCS. Po 24 hodinách byly buňky promyty médiem prostým séra a inkubovány po dobu 48 hodin s DMEM + 0,5 % FCS. Potom byly ještě buňky inkubovány 16 hodin s FGF-2 o koncentraci 15 a 30  $ng \cdot ml^{-1}$  v přítomnosti nebo nepřítomnosti zkoušených sloučenin (všechny při 100  $\mu g \cdot ml^{-1}$ ). Na konci inkubace byl bez výměny
- 15 média přidán 3H-thymidin (0,25  $\mu Ci$  na jednu jamku). Po 6 hodinách byla měřena sraženina TCA. Každý pokusný bod je střední hodnotou ze 3 stanovení. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Inhibice syntézy DNK v buňkách L6 ovlivněných FGFR-1

5

Produkt	Inkorporace 3H-thymidinu (% proti slepému pokusu)
heparin (FGF-2 15 ng.ml <sup>-1</sup> )	50
heparin (FGF-2 30 ng.ml <sup>-1</sup> )	74
heparin RO (FGF-2 15 ng.ml <sup>-1</sup> )	41
heparin RO (FGF-2 30 ng.ml <sup>-1</sup> )	80
ST1513 (FGF-2 15 ng.ml <sup>-1</sup> )	93
ST1513 (FGF-2 30 ng.ml <sup>-1</sup> )	102
G3025B (FGF-2 15 ng.ml <sup>-1</sup> )	68
G3025B (FGF-2 30 ng.ml <sup>-1</sup> )	71
ST1514 (FGF-2 15 ng.ml <sup>-1</sup> )	58
ST1514 (FGF-2 30 ng.ml <sup>-1</sup> )	99
ST1515 (FGF-2 30 ng.ml <sup>-1</sup> )	79
ST1515 (FGF-2 30 ng.ml <sup>-1</sup> )	100

Ovlivnění syntézy DNK v bovinních endotheliálních buňkách aorty (BAEC)

- 10 Buňky BAEC byly naočkovány na 48 jamkové plotny v koncentraci 2500 buněk na cm<sup>2</sup> v kompletním médiu soupravy EGM Bullet Kit. Po 24 hodinách byly buňky kultivovány v nepřítomnosti séra v EGM médiu bez bovinního mozkového extraktu a hEGF. Po dalších 24 hodinách bylo na buňky působeno 30 ng.ml<sup>-1</sup> bFGF v přítomnosti zvyšujících se koncentrací zkoušených sloučenin. Po 16 hodinách bylo k médiu přidáno 1 μCi.ml<sup>-1</sup> 3H-thymidinu. Po 6 hodinách byla
- 15 změřena aktivita sraženiny TCA. Každý pokusný bod je střední hodnotou z 8 stanovení. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 3 až 6.

Tabulka 3

Ovlivnění syntézy DNK v bovinních endotheliálních buňkách aorty (BAEC) – ST1514

5

Koncentrace ng.ml <sup>-1</sup>	Inkorporace <sup>3</sup> H-thymidinu (% proti slepému pokusu)
1	80
10	78
100	42
1000	33
10000	22
100000	5

Tabulka 4

10

Ovlivnění syntézy DNK v bovinních endotheliálních buňkách aorty (BAEC) – ST1528

Koncentrace ng.ml <sup>-1</sup>	Inkorporace <sup>3</sup> H-thymidinu (% proti slepému pokusu)
1	85
10	73
100	85
1000	32
10000	28
100000	5

Tabulka 5

Ovlivnění syntézy DNK v bovinních endoteliálních buňkách aorty (BAEC) – ST1525

Koncentrace ng.ml <sup>-1</sup>	Inkorporace <sup>3</sup> H-thymidinu (% proti slepému pokusu)
1	75
10	67
100	26
1000	21
10000	7
100000	2

5

Tabulka 6

10 Ovlivnění syntézy DNK v bovinních endoteliálních buňkách aorty (BAEC) – ST1507

Koncentrace ng.ml <sup>-1</sup>	Inkorporace <sup>3</sup> H-thymidinu (% proti slepému pokusu)
1	92
10	92
100	45
1000	40
10000	18
100000	12

## Zkouška proliferace buněk v BAEC

15

Buňky BAEC ze 7. pasáže byly naočkovány na 96 jamkové plotny v koncentraci 2500 buněk na cm<sup>2</sup> do média EBM bez bovinního mozkového extraktu a hEGF. K tomuto médiu bylo přidáno 30 ng.ml<sup>-1</sup> FGF-2 a každá ze zkoušených sloučenin v 5 koncentracích sahajících od 10 ng.ml<sup>-1</sup> do 100 μg.ml<sup>-1</sup>. Po 3 dnech byly buňky zafixovány, obarveny krystalovou violetí a optická hustota změřena čtečkou na mikroděstičky ELISA. Každý pokusný bod byl proveden čtyřnásobně a vypočítána hodnota ID<sub>50</sub>. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

20

Tabulka 7

Zkouška proliferace buněk v BAEC

Produkt	Inhibice (ID <sub>50</sub> ) μg.ml <sup>-1</sup>
heparin	100
ST1509	0,02
ST1525	10
ST1526	0,02
ST1527	100
ST1528	0,1

5

Zkouška proliferace buněk ve fetálním BAEC GM 7373

Buňky GM7373 v MEM + 10% médiu FCS byly naočkovány na 96 jamkové plotny v koncentraci 7000 buněk na cm<sup>2</sup>. Po 24 hodinách byly buňky promyty médiem prostým séra a působeno na ně 10ng.ml<sup>-1</sup> FGF-2 v médiu obsahujícím 0,4 % FCS. Po 8 hodinách byly k médiu přidány zkoušené sloučeniny v 5 koncentracích sahajících od 10 ng.ml<sup>-1</sup> do 100 μg.ml<sup>-1</sup>. Po dalších 16 hodinách byly buňky trypsinizovány a počítána v Burkerově komůrce. Pro každou sloučeninu byla vypočítána hodnota ID<sub>50</sub> a výsledek je střední hodnotou ze 2 pokusů provedených trojnásobně. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

15

Tabulka 8

20 Zkouška proliferace buněk ve fetálním BAEC GM 7373

Produkt	Inhibice (ID <sub>50</sub> ) μg.ml <sup>-1</sup>
heparin	2
ST1509	0,3
ST1525	2
ST1526	1
ST1527	20
ST1528	0,2
ST1514	0,1

## Inhibice angiogeneze

Model použitý ke studiu angiogeneze byl modelem chorioallantoidní membrány kuřecího embrya (CAM) (Ribatti, et al., Int. J. Dev. Biol., 40, 1189, 1996).

300 slepičích vajec s embryi bylo inkubováno při 37 °C při konstantní vlhkosti. Třetí den inkubace po odsátí 2 až 3 ml albuminu z ostřejšího vrcholu vajíčka tak, aby se CAM oddělila od skořápky, bylo ve skořápce nůžkami vystříženo okénko. Prostor pod CAM byl potom exponován. Okénko bylo uzavřeno průhledným skleněným panelem a vajíčko vloženo zpět do inkubátoru. Osmý den inkubace bylo za sterilních podmínek na CAM působeno podle postupu dále popsaného za využití techniky již dříve vyvinuté (Ribatti, et al., J. Vasc. Res., 34, 455, 1997), která spočívá v použití sterilních želatinových bločků měřících 1 mm<sup>2</sup>.

Každá látka byla resuspendována ve 3 µl PBS o koncentraci 50 nebo 100 µg na jedno embryo. Pro pozitivní kontrolu byl použit FGF-2 (1 µg na bloček), na kterém se případný angiogenní účinek na CAM demonstroval (Ribatti, et al., Dev. Biol., 170, 39, 1995). Bločky byly nejprve pokládány na povrch CAM a potom se na povrch bločku napipetovaly 3 µl roztoku zkoušené látky. CAM byly denně prohlíženy na Zeissově stereomikroskopu vybaveném fotografickým zařízením. Zkoušky byly přerušeny 12. den inkubace, když proběhlo celkové hodnocení angiogenních účinků látek, a výsledek byl vyjádřen jako procento inhibice v závislosti na počtu pokusů započatých a uzavřených (tabulka 9). Sloučenina ST1514 byla navíc zkoušena s koncentrací 100 µg na jedno embryo a též bylo provedeno makroskopické kvantitativní vyhodnocení angiogenního účinku technikou navrženou Brooksem, et al (Science, 264, 569, 1994) počítáním počtu bodů obklopujících bloček. Počet bodů byl porovnáván s kontrolními bločky napuštěnými PBS (vehikulum zkoušené sloučeniny) a s FGF-2 (pozitivní kontrola).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 9

Angiostatický účinek na model CAM

Sloučenina	Koncentrace (µg na embryo)	Počet pokusů	Inhibice (%)
N-acetylovaný heparin	50	10	0
RO heparin (ox-red 19,6 %)	50	10	20
ST1514 (RO 56 %)	50	10	50
ST1514 (RO 56 %)	100	10	80

Je nutno poznamenat, že přirozeně se vyskytující heparin nemá žádné účinky.

Tabulka 10

Angiostatický účinek: makroskopické kvantitativní vyhodnocení (Brooks)

5

Sloučenina	Počet embryí	Počet bodů na bloček/rozhraní CAM
ST1514 (100 µg na embryo)	10	2 + 1
PBS (3 µl)	5	7 + 2
FGF-2 (1 µg na embryo)	5	50 + 4

Je nutno poznamenat, že přirozeně se vyskytující heparin nemá žádné účinky.

## 10 Vyhodnocení toxicity heparinu v myším Balb/c

Na 20 šestitýdenních samic myši Balb/c o hmotnosti 20 g (Harlan) rozdělených náhodně do skupin bylo jako referenční látkou působeno heparinát sodným a sloučeninou podle předloženého vynálezu nazývanou ST1514. Pokusné schéma bylo typu q2dx5, tj. 5 celkových podání v intervalech 2 dnů, podávaných v roztoku 50 a 25 mg.kg<sup>-1</sup>.10 ml<sup>-1</sup> subkutánně v dávkách 200 µl na myš.

15

Látky byly rozpouštěny takto:

Heparinát sodný: roztok byl připraven rozpuštěním 160 mg prášku ve 4 ml PBS 1x prostého Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> o pH 7,4; tento roztok byl rozdělen na alikvotní podíly po 243 µl a skladován při -20 °C. V době zkoušky byl roztok zředěn PBS 1x prostým Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> (Dulbecco, upravené složení) o pH 7,4 tak, aby se získala konečná koncentrace 50 a 25 mg.kg<sup>-1</sup>.10 ml<sup>-1</sup>.

20

ST1514: roztok byl připraven rozpuštěním 160 mg prášku ve 4 ml PBS 1x prostého Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> o pH 7,4; tento roztok byl rozdělen na alikvotní podíly po 243 µl a skladován při -20 °C. V době zkoušky byl roztok zředěn PBS 1x prostým Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> (Dulbecco, upravené složení) o pH 7,4 tak, aby se získala konečná koncentrace 50 a 25 mg.kg<sup>-1</sup>.10 ml<sup>-1</sup>.

25

48 hodin po posledním podání zkoušené sloučeniny byly odebrány vzorky krve na úplný krevní obraz a hematologickou analýzu.

30

Vzorkování krve: myši byly umístěny v hermeticky uzavřeném boxu, do kterého byl napuštěn CO<sub>2</sub> v dostatečném množství, aby se zvířata ochromila. Potom byla každému zvířeti odebrána krev z retroorbitálního plexu (přibližně 1 ml krve na jednu myš), která byla rozdělena v množství 0,4 ml krve z jedné myši do Eppendorfovy zkumavky obsahující 20 µl heparinu Vister (5000 j.ml<sup>-1</sup>) k provedení úplného krevního obrazu a hematologické analýzy; stejné množství krve bylo dáno do Eppendorfovy zkumavky obsahující 50 µl 3,8% citranu sodného ke stanovení prothrombinového času. Po odebrání krevních vzorků byla zvířata utracena cervikální dislokací.

35

Počet vzorků: byly odebrány 2 vzorky krve od každé myši, ze kterých byl dvakrát stanoven úplný krevní obraz, připraveny dva vzorky na podložní sklíčka a vyrobeny vzorky plasmy ke skladování při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5 Úplný krevní obraz: bylo použito zařízení (Cell Analyzer 580 A, DELCON) se standardním postupem popsáním v provozní příručce. Krevní vzorky ( $25\text{ }\mu\text{l}$ ) byly odebrány zředovacím zařízením a upraveny na objem  $10\text{ ml}$  (ředění  $1 : 400$ ) isotonickým roztokem (PLTA fyziologický roztok, DELCON). Z tohoto roztoku (nazvaného roztok A) odebírá zředovací zařízení automaticky vzorky  $100\text{ }\mu\text{l}$  a upravuje je na objem  $10\text{ ml}$  (ředění  $1 : 100$ ), čímž se získá roztok B. K roztoku A se přidají 3 kapky Emosolu (DELCON) k lyzování červených krvinek. Tento roztok se použije k odečtu WBC. Roztok B se naopak použije k odečtu RBC a krevních destiček (PLT). Každý vzorek se odečítá duplicitně.

Získané hodnoty se analyzují za použití ANOVA.

15 Skupiny zvířat v pokusu s heparinátém sodným v dávkách  $50$  a  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 10\text{ ml}^{-1}$  vykazují významný hematom na straně inokulace; tento jev nenastává u skupin podrobených působení ST1514. Autopsie provedená ve studii zvířat prozrazuje, že skupiny podrobené působení heparinátu sodného v dávkách  $50$  a  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 10\text{ ml}^{-1}$  mají játra s abnormálními charakteristikami, zatímco takovýto jev nebyl pozorován u skupin s podávaným ST1514.

20 Hodnoty týkající se hematologické analýzy ukazují při porovnání s kontrolní skupinou na snížení počtu červených krvinek jak u skupin s podávaným heparinátém sodným v dávkách  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 10\text{ ml}^{-1}$ , tak  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 10\text{ ml}^{-1}$ , zatímco u skupin s podávaným ST1514 žádný takový rozdíl nebyl pozorován.

25 Skupina s podávaným heparinátém sodným v dávce  $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ukazuje při porovnání s kontrolní skupinou na významný nedostatek krevních destiček. Žádná ze studovaných pokusných skupin v porovnání s kontrolní skupinou nemá významné rozdíly v počtu bílých krvinek.

30

#### Příklady provedení vynálezu

Následující příklady dále objasňují vynález.

35

#### Příklad 1

40  $1\text{ g}$  heparinu se rozpustí ve  $12,5\text{ ml}$   $1\text{ N}$  NaOH. Roztok se zahřívá a míchá při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu  $45$  minut. Reakce se zablokuje rychlým ochlazením a neutralizací. Roztok se potom zahřívá na  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  při pH  $7$ , až se epoxidový kruh zcela otevře (spád reakce se kontroluje NMR). Desulfátovaný vzorek (zde nazývaný G2999H) se rozpustí ve  $20\text{ ml}$  vody a ochladí na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po přidání  $20\text{ ml}$   $0,2\text{ M}$  roztoku  $\text{NaIO}_4$  se roztok ponechá míchat v temnu po dobu  $20$  hodin, reakce se zastaví přidávkem ethylenglykolu a sole se odstraní tangenciální ultrafiltrací.

45

K odsolenému roztoku ( $30$  až  $40\text{ ml}$ ) se přidá  $400\text{ mg}$   $\text{NaBH}_4$  rozdělených do několika dávek. Roztok se ponechá míchat po dobu  $3$  hodin při okolní teplotě, potom se zneutralizuje zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a odsolí tangenciální ultrafiltrací. Získá se  $710\text{ mg}$  produktu zde nazývaného ST1514.

50

Molekulová hmotnost (m.hm.):  $11200$ , polydisperzní index  $D$   $1,3$ , desulfatační stupeň  $1,9$  (vyjádřený jako molární poměr  $\text{SO}_3^- : \text{COO}^-$ ); procento modifikovaných kyselin uronových vztaženo na celkové kyseliny uronové je přibližně  $50\%$ . Sloučenina byla charakterizována pomocí NMR spektroskopie (obrázek 1).

55

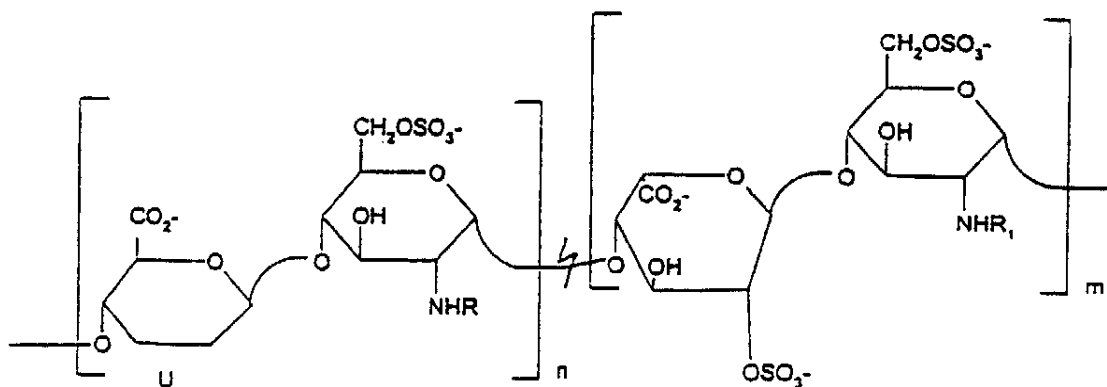
## Příklady 2 až 4

5 Při použití stejného způsobu jako u příkladu 1 s tou výjimkou, že se bazický roztok zahřival po dobu 15, 30 a 60 minut, se získaly sloučeniny s následujícími charakteristikami:

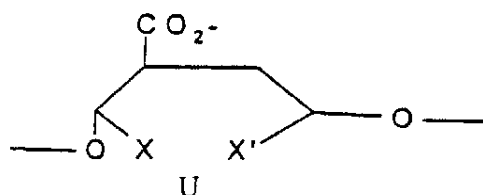
- ST1513: molekulová hmotnost (m.hm.) 12900, polydisperzní index D 1,5, desulfatační stupeň 2,5 (vyjádřený jako molární poměr  $\text{SO}_3^-$  :  $\text{COO}^-$ ); procento modifikovaných kyselin uronových vztaheno na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovaných (štěpných) uronových zbytků;
- ST1516: molekulová hmotnost (m.hm.) 12900, polydisperzní index D 1,5, desulfatační stupeň 1,8 (vyjádřený jako molární poměr  $\text{SO}_3^-$  :  $\text{COO}^-$ ); procento modifikovaných kyselin uronových vztaheno na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovaných (štěpných) uronových zbytků;
- ST1515: molekulová hmotnost (m.hm.) 9200, polydisperzní index D 1,5, procento modifikovaných kyselin uronových vztaheno na celkové kyseliny uronové: 11 % epoxidových skupin, 27,5 % oxidovaných a redukovaných (štěpných) uronových zbytků.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. 2-O-desulfatovaný glykosaminoglykanový derivát podobný heparinu, zvláště 2-O-desulfatovaný heparin, s 2-O-desulfatačním stupněm ne vyšším než 60 % z celkových uronových jednotek, přičemž derivát je modifikovaným heparinem, obsahující glykosaminové zbytky o různém stupni N-desulfatace a případně následně celkově nebo částečně N-acetylovaný, **v y z n a -**  
 30 **č u j í c í s e t í m**, že je sloučeninou obecného vzorce I:



35 kde U kruh má následující význam:



X a X' jsou stejné nebo různé a jsou vybrány ze skupiny tvořené aldehydovými skupinami nebo skupinou  $-\text{CH}_2-\text{D}$ , kde D je hydroxyl nebo aminokyselina, peptid nebo zbytek cukru nebo oligosacharid;

5 R a R<sub>1</sub> jsou stejné nebo různé, a jsou vybrány ze skupiny tvořené  $\text{SO}_3^-$  nebo acetylovým zbytkem;

n a m, které mohou být stejné nebo různé se mohou měnit od 1 do 40; součet  $n + m$  se pohybuje od 6 do 40; poměr  $m : n$  se pohybuje od 10 : 2 do 1 : 1, symbol „<sup>4</sup>7“ značí, že jednotky označené m a n jsou statisticky rozděleny podél polysacharidového řetězce a nenásledují nutně za sebou.

15 **2.** Derivát podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je částečně 2-O-desulfatovaným heparinem s molekulovou hmotností (m.hm.) 11200, polydisperzním indexem D rovným 1,3, desulfatačním stupněm 1,99 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^- : \text{COO}^-$ ), procentem modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové, přibližně 50 %.

20 **3.** Derivát podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je částečně 2-O-desulfatovaným heparinem s molekulovou hmotností (m.hm.) 12900, polydisperzním indexem D rovným 1,5, desulfatačním stupněm 2,05 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^- : \text{COO}^-$ ), procentem modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovaných zbytků kyseliny uronové.

25 **4.** Derivát podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je částečně 2-O-desulfatovaným heparinem s molekulovou hmotností (m.hm.) 11000, polydisperzním indexem D rovným 1,5, desulfatačním stupněm 1,93 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^- : \text{COO}^-$ ), procentem modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukovaných zbytků kyseliny uronové.

30 **5.** Derivát podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že je částečně 2-O-desulfatovaným heparinem s molekulovou hmotností (m.hm.) 9200, polydisperzním indexem D rovným 1,5, procentem modifikované kyseliny uronové, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 11 % epoxidových skupin, 27,5 % oxidovaných a redukovaných zbytků kyseliny uronové.

35 **6.** Postup přípravy derivátů podle nároků 1 až 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje následující stupně:

40 a) základní zpracování při teplotě pohybující se od okolní teploty přibližně do 100 °C, přednostně od 50 do 70 °C, a ještě lépe přibližně při 65 °C, což vede k řízené eliminaci obsahu sulfátových skupin v poloze 2 kyseliny iduronové a k tvorbě epoxidových skupin; a pokud je potřeba

45 b) otevření epoxidového kruhu přibližně při pH 7 za teploty pohybující se v rozsahu přibližně od 50 °C přibližně do 100 °C, lépe však přibližně při 70 °C, což vede ke zbytkům kyseliny galakturonové; nebo alternativně

c) otevření jmenovaného epoxidového kruhu při teplotě pohybující se přibližně od 0 do 30 °C, lépe přibližně při 25 °C za vzniku zbytků kyseliny iduronové; a pokud je třeba

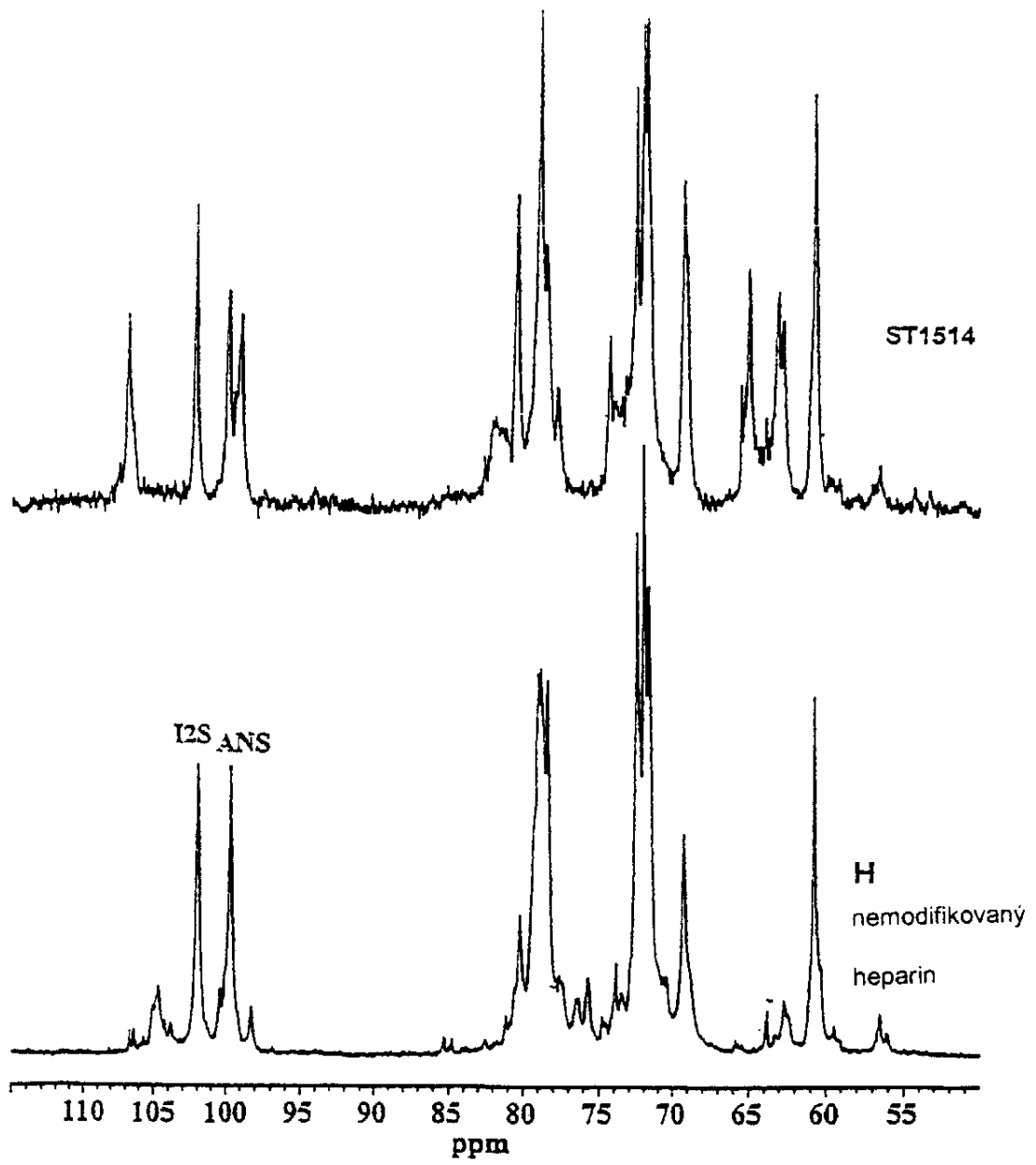
50 d) oxidaci diolů jodistanem sodným, což vede k otevření glykosidového kruhu a vytvoření dvou aldehydových skupin na jeden modifikovaný zbytek;

e) redukci jmenovaných aldehydových skupin na primární alkohol a pokud to je potřeba, transformaci skupiny D na skupinu jinou než hydroxyl, jak se s tím počítá ve významu podle nároku 1;

- f) případnou kyselou hydrolyzu k získání oligosacharidů majících pravidelné sekvence, či alternativně
- 5 g) částečnou enzymatickou hydrolyzu enzymem vybíraným ze skupiny sestávající z lyázy, heparinázy, heparitinázy nebo ekvivalentní látky získané ve stupni e), aby vedly k získání oligosacharidů, přednostně tetra- nebo oktasacharidů, s neredukujícím koncovým zbytkem obsahujícím nenasyčenou kyselinu iduronovou, kde redukující zbytek sestává z N-sulfo-glukosaminu a obsahuje alespoň jeden zbytek otevřené kyseliny iduronové; nebo alternativně
- 10 h) sloučenina získaná ve stupni a) nebo produkt získaný ve stupni b) se částečně enzymaticky hydrolyzuje; a pokud je potřeba
- 15 i) produkty se podrobí jednomu z kroků a), b) a e) k částečné 6-O-desulfataci; nebo alternativně
- j) výchozí heparin se podrobí částečné nebo úplné 6-desulfataci v krocích a), b) a e).
- 20 7. Postup přípravy částečně 2-O-desulfatovaného heparinu, majícího molekulovou hmotnost (m.hm.) 11200, polydisperzní index D rovný 1,3, desulfatační stupeň 1,99 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^-$ :  $\text{COO}^-$ ), procento modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové, přibližně 50 %, podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že se stupeň a) provádí po dobu 45 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7.
- 25 8. Postup přípravy částečně 2-O-desulfatovaného heparinu, majícího molekulovou hmotnost (m.hm.) 12900, polydisperzní index D rovný 1,5, desulfatační stupeň 2,05 (vyjádřeno jako molární poměr  $\text{SO}_3^-$ :  $\text{COO}^-$ ), procento modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukováných uronových
- 30 zbytků, podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že se stupeň a) provádí po dobu 15 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7.
9. Postup přípravy částečně 2-O-desulfatovaného heparinu majícího molekulovou hmotnost (m.hm.) 11000, polydisperzní index D rovný 1,5, desulfatační stupeň 1,80 (vyjádřeno jako
- 35 molární poměr  $\text{SO}_3^-$ :  $\text{COO}^-$ ), procento modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 5 % epoxidových skupin, 29 % oxidovaných a redukováných uronových zbytků, podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že se stupeň a) provádí po dobu 30 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7.
- 40 10. Postup přípravy částečně 2-O-desulfatovaného heparinu majícího molekulovou hmotnost (m.hm.) 9200, polydisperzní index D rovný 1,5, procento modifikovaných kyselin uronových, vztaženo na celkové kyseliny uronové: 11 % epoxidových skupin, 27,5 % oxidovaných a redukováných uronových zbytků, podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že se stupeň a) provádí po dobu 60 minut při 60 °C a stupeň b) při 70 °C při pH 7.
- 45 11. Směsi oligosacharidů s antiangiogenním účinkem, vyrobitelné kyselou degradací sloučenin podle nároků 1 až 5.
12. Směsi oligosacharidů s antiangiogenním účinkem, vyrobitelné ve stupni f) postupu podle
- 50 nároku 6.
13. Směsi oligosacharidů s antiangiogenním účinkem, vyrobitelné ve stupni g) postupu podle nároku 6.

14. Směsi oligosacharidů s antiangiogenním účinkem, vyrobitelné ve stupni h) postupu podle nároku 6.
- 5 15. Směsi oligosacharidů s antiangiogenním účinkem, vyrobitelné ve stupni i) postupu podle nároku 6.
16. Farmaceutický přípravek obsahující alespoň jednu sloučeninu podle nároků 1 až 5 a/nebo 11 až 15 jako účinnou složku ve směsi s farmaceuticky přijatelný vehikuly a excipienty.
- 10 17. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 jako léčiv.
18. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva s antiangiogenním účinkem.
- 15 19. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva k léčbě patologických stavů způsobených abnormální angiogenezí.
- 20 20. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva k léčbě nádorů, případně spojených s metastázami.
21. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva k léčbě nádorových metastáz.
- 25 22. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva k léčbě diabetické retinopatie.
23. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva k léčbě retrolentikulární fibroplazie.
- 30 24. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva k léčbě psoriázy.
- 35 25. Použití sloučenin podle nároků 1 až 5 a 11 až 15 nebo podle nároku 17 k přípravě léčiva k léčbě restenóz po angioplastice a po koronárním by-passu.

1 výkres



Obr. 1

Konec dokumentu