

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2022-466
(22) Přihlášeno: 10.11.2022
(40) Zveřejněno: 22.05.2024
(Věstník č. 21/2024)
(47) Uděleno: 07.05.2025
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 18.06.2025
(Věstník č. 25/2025)

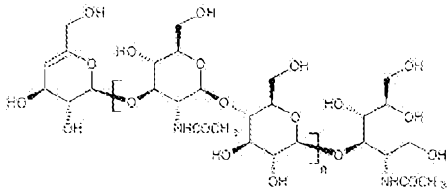
C07H 13/04 (2006.01)
C12P 19/26 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
JEDRZEJAS, Mark J., et al. Mechanism of Hyaluronan Degradation by *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronate Lyase: STRUCTURES OF COMPLEXES WITH THE SUBSTRATE. Journal of Biological Chemistry. ASBMB, 2002, Vol. 277, No. 31, p. 28287-28297, ISSN 0021-9258; UCHIYAMA, Hideki, et al. Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. Journal of Biological Chemistry. ASBMB/Elsevier, 1990, Vol. 265, No. 14, p. 7753-7759., ISSN 1083-351X; EL-SAFORY, Nermeen S.; LEE, Cheng-Kang. Cytotoxic and antioxidant effects of unsaturated hyaluronic acid oligomers. Carbohydrate polymers, 2010, Vol. 82, No. 4, p. 1116-1123, ISSN 0144-8617.

(73) Majitel patentu:
Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ
(72) Původce:
Tomáš Klejch, Litomyšl, Litomyšl-Město, CZ
Radovan Buffa, Humenné, SK
Jiří Bednařík, Ústí nad Orlicí, CZ
Martina Brandejsová, Letohrad, CZ
Hana Vágnerová, Dolní Čermná, CZ
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ
(74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název vynálezu:
**Nenasycené oligosacharidy, způsob jejich
přípravy a jejich použití**

(57) Anotace:
Oligosacharidy vzorce I jsou složeny ze střídajících se glukózových a N-acetylglukosaminových jednotek s dvojnou vazbou v poloze 4 terminálního neredukujícího sacharidu (glukózy) a s primární hydroxylovou skupinou v poloze 1 N-acetylglukosaminu na redukujícím konci. Postup přípravy je založen na enzymatickém nebo chemickém štěpení polymerní kyseliny hyaluronové anebo jejich esterů a následné redukci esterů oligosacharidů s borohydridem sodným. Materiály obsahující oligasacharidy vzorce I vykazují zvýšenou odolnost vůči enzymatické degradaci (bovinní testikulární hyaluronidáza, *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyáza), a také selektivní negativní vliv na viabilitu některých linií rakovinových buněk.

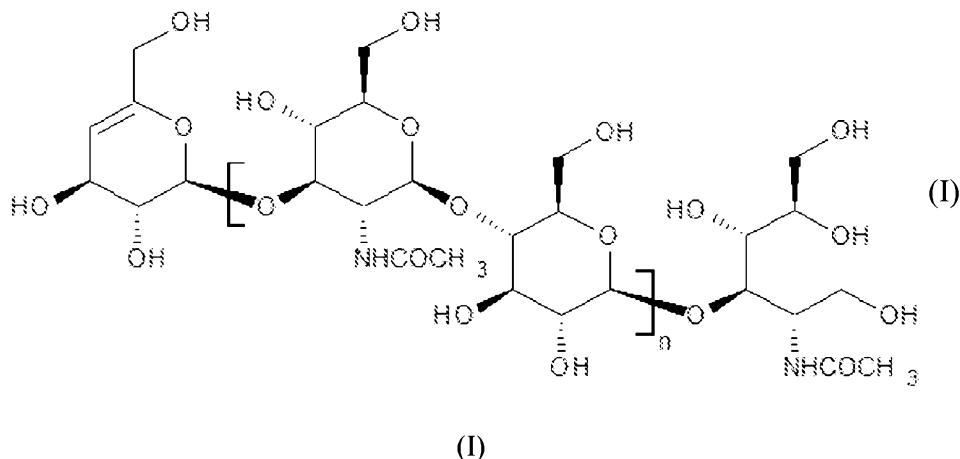


Nenasycené oligosacharidy, způsob jejich přípravy a jejich použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká oligosacharidů složených ze střídajících se glukózových a *N*-acetylglukosaminových jednotek, s nenasycenou glukózovou jednotkou na neredukujícím konci a redukováným anomerním koncem podle strukturního vzorce I:



10

- kde $n = 0$ až 10,

15 jejich přípravy a způsobu použití. Oligosacharid s touto strukturou vykazuje zvýšenou odolnost vůči enzymatické degradaci a negativně ovlivňuje růst některých linií rakovinových buněk.

Dosavadní stav techniky

20

Postupná syntéza oligosacharidů

25 Syntéza penta- a hexasacharidů se střídajícími se jednotkami glukózy a *N*-acetylglukosaminu spojenými 1→3 vazbou s methoxyfenylovou skupinou na redukujícím konci byla popsána v článku (Halkes, K. M. a kol.: Carbohydrate Research, 30, 161-174, 1998). Pro spojení chráněných sacharidů byla používána trichloracetimidátová aktivace za katalýzy fluoridem boritým nebo trimethylsilyl trifluormethansulfonátem ve výtěžku 69 až 81 %.

30 V publikaci (Lin, Ch.-Ch. a kol.: Journal of the Chinese Chemical Society, 47, 921-928, 2000) byla popsána příprava disacharidu β -D-Glukopyranosyl(1→3)-1-thiol- β -glukosaminu jako stavební jednotky pro přípravu delších oligosacharidů. Donor glukózové jednotky je syntetizován v 9 krocích, glukosaminový akceptor v 5 krocích, spojení obou jednotek a změna chránících skupin probíhá ve 3 krocích.

35 One-pot syntéza chráněného disacharidu, tetrasacharidu a hexasacharidu se střídajícími se jednotkami glukózy a *N*-acetylglukosaminu spojenými 1→3 vazbou byla popsána v článku (Huang, L.; Huang, X.: Chemistry – a European Journal, 13, 529-540, 2007). Monosacharidy nebo disacharidy byly připojovány s výtěžkem 54 až 75 % pro glykosylaci.

40 Obecně lze konstatovat, že postupná syntéza oligosacharidů je náročná, zahrnuje mnoho chránících a odchránovacích kroků, práci v toxických rozpouštědlech a má nízkou výtěžnost, zejména pro delší oligosacharidy. Nevýhodou je také nutná a mnohdy obtížná kontrola stereochemie vznikajících glykosidických vazeb. Další nevýhodou může být použití tvrdých

podmínek (silně kyselé prostředí), které mohou vést k rozkladu sacharidových cyklů obsahujících dvojnou C=C vazbu.

Sacharidy obsahujících násobné vazby

5

Byla popsána příprava nenasycených esterů uronových kyselin pomocí β -eliminace v bazickém prostředí (BeMiller, J. N. a kol: Carbohydrate research, 25, 419-428, 1972). Aby bylo zabráněno nežádoucí hydrolyze, byla eliminace prováděna methoxidem sodným v methanolu. Algináty jsou depolymerizovány pomaleji než pektiny.

10

Zahříváním pektinu ve slabě kyselém vodném roztoku (pH=6,1) lze získat kratší fragmenty obsahující dvojnou vazbu (Sajjaanantakul, T. a kol: Journal of Food Science, 54, 5, 1272-1277, 1989). Intenzita štěpení se zvyšuje s rozsahem esterifikace karboxylových funkcí methylovou skupinou. V této práci byla štěpena nejvýše 2 % glykosidických vazeb.

15

Byla popsána příprava sacharidu s dvojnou vazbou v poloze 4 a 5 (Mathad, V. T. a kol.: Indian Journal of Chemistry, 36B, 808-809, 1997). V prvním kroku je provedena acetylace hydroxylových skupin, následuje oxidace polohy 6 na aldehyd se simultánní tvorbou dvojné vazby, poté je aldehyd redukován NaBH_4 , a nakonec jsou v bazickém prostředí odstraněny acetylové skupiny.

20

25

Bylo popsáno několik způsobů, jak zavést násobnou $\text{C}=\text{C}$ - vazbu přímo do sacharidového cyklu v polymerním řetězci. Jedním z nich je enzymatické štěpení polymerů pomocí lyáz, kde dvojná vazba vzniká na neredukujícím konci polymeru (Kelly S. J. a kol. *Glycobiology*, 11, 4, 294-304, 2001), v tomto případě kyseliny hyaluronové.

30

Další způsob umožňuje zavést dvojnou vazbu do struktury různých glykosaminoglykanů v poloze 4 a 5 po celé délce řetězce, takže lze efektivně modifikovat i polymery s vyšší molekulovou hmotností (Buffa R. a kol. CZ 305106, WO 2014023272 A1). Tyto materiály vykazovaly selektivní negativní vliv na viabilitu rakovinových buněk.

35

Dále bylo popsáno alkalické štěpení benzylesteru chondroitin sulfátu ve směsi DMF/EtOH/EtONa (Gao, N. a kol.: Carbohydrate Polymers, 127, 427-437, 2015). Takto vzniklé oligosacharidy vykazovaly po deesterifikaci lepší antikoagulační účinky než nízkomolekulární heparin.

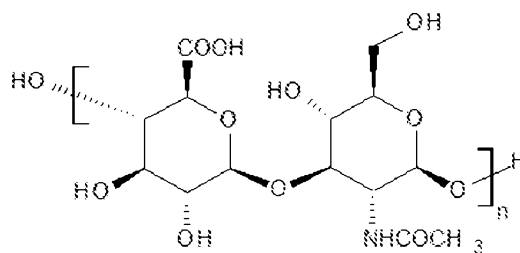
40

Obecně lze konstatovat, že nenasycené oligosacharidy lze připravit enzymatickým nebo chemickým štěpením. Chemické štěpení je nejčastěji prováděno bazicky a vyžaduje aktivaci, například převedením alkoholu na aldehyd nebo karboxylové kyseliny na její ester. Pro štěpení lze využít jak oligosacharidy, tak i polysacharidy.

Kyselina hyaluronová

45

Kyselina hyaluronová nebo její sodná sůl je nesulfatovaný glykosaminoglykan složený ze dvou opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu (vzorec II).



(II)

Vzorec II.

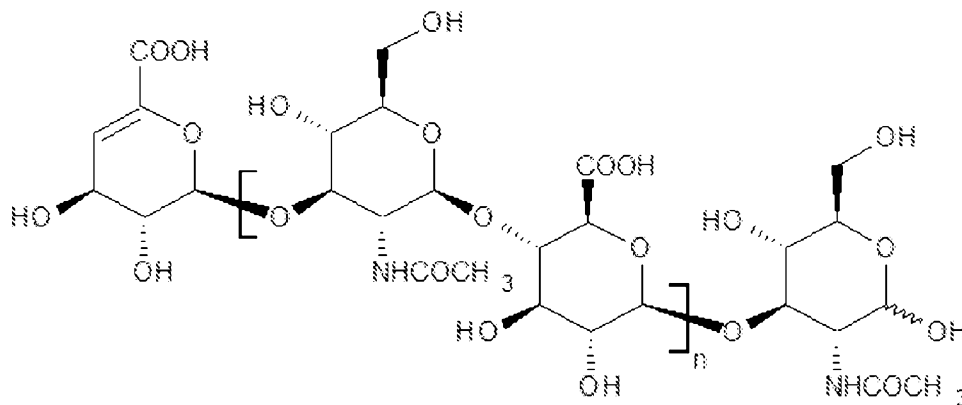
5

Molekulová hmotnost nativní kyseliny hyaluronové může dosáhnout až $5 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Tento polysacharid tvoří významnou součást pojivových tkání, kůže a synoviální tekutiny kloubů a hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je hydratace, diferenciace buněk a organizace proteoglykanů. Kyselina hyaluronová se v biologických systémech přirozeně vyskytuje, tudíž je přirozeně biodegradovatelná a biokompatibilní. Proto je vhodným substrátem pro širokou škálu biomedicinských aplikací.

10

Kyselina hyaluronová je v biologických podmínkách degradována hydrolázami a lyázami. V prvním případě si produkty zachovávají strukturu dle vzorce II, dochází pouze ke zkrácení řetězce. Pokud je kyselina hyaluronová štěpena lyázou, dochází ke vzniku řetězce s dvojnou vazbou na koncovém sacharidu na neredukujícím konci (vzorec III). Biologické účinky oligomerní a polymerní kyseliny hyaluronové se výrazně liší (Russo, R. I. C. a kol.: International journal of cancer, 122, 1012-1018, 2008), záleží i na způsobu štěpení hyaluronanu (Jobe, K. L. a kol.: Immunology letters, 89, 99-109, 2003).

20



(III)

Vzorec III.

25

Redukce karboxylových kyselin

Redukci alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují acetylové a jiné esterové skupiny, lze uskutečnit pomocí komplexu dimethylsulfid/boran v tetrahydrofuranu (Williams S. J. a kol.: Journal of the American Chemical Society, 122, 10, 2223 – 2235, 2000) Reakce probíhá při 20 °C s tím, že je potřebný delší reakční čas (až 72 hodin).

30

Použití boranů generovaných systémem ($\text{NaBH}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$) na redukci alifatických karboxylových kyselin obsahujících éterické skupiny byla popsána v patentu (Haldar P. a kol.: US 250454, 2011). Reakce probíhala 45 minut v tetrahydroforanu a diethyletheru v teplotním rozmezí 0 až 35 °C.

35

Selektivní redukce alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují hydroxylové skupiny a ethery, byla popsána v článku (Murray J. a kol.: Chem. Comm., 50, 88, 13608 – 13611, 2014). Reakce probíhá 12 hodin při 0 až 60 °C v inertní atmosféře a jako redukční činidlo byl použit systém ($\text{NaBH}_4 + \text{I}_2$) v tetrahydrofuranu.

Efektivní redukci nízkomolekulárních alifatických i aromatických karboxylových kyselin na příslušné alkoholy lze uskutečnit s nadbytkem (3 až 4 ekvivalenty) pinakol boranu při 20 °C bez přítomnosti rozpouštědel a katalyzátoru (Harinath A. a kol.: Chem. Comm., 10, 55, 1386-9, 2019). Tento přístup ale nelze použít pro molekuly obsahující velké množství hydroxylových skupin, které by rychle reagovaly s boranem za vzniku vodíku.

Obecně lze konstatovat, že při redukcích karboxylových kyselin buď přímo s borany, nebo s borany v komplexu s dimethylsulfidem, nebo s borany generovanými *in situ*, je použití protických rozpouštědel nevhodné s ohledem na rychlou reakci boranů s vodíkem rozpouštědla za vzniku molekulárního vodíku. Tyto reakce probíhají efektivně buď v aprotických systémech (étery), nebo bez přítomnosti rozpouštědla.

Redukci alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují esterové skupiny, lze uskutečnit pomocí dvoukrokové syntézy, kde se v prvním kroku aktivuje karboxylová skupina pomocí oxalyl dichloridu v *N,N*-dimethylformamidu, tetrahydrofuranu, dichloromethanu nebo acetonitrilu při -78 až + 20 °C, a v druhém kroku se aktivovaná karboxylová skupina redukuje s lithiium tri-(*tert*-butoxy)aluminium hydridem v tetrahydrofuranu, dichloromethanu a acetonitrilu při 20 °C v čase 1,5 hodiny (Chany A.-C. a kol.: Organic and Biomolecular Chemistry, 13, 35, 9190 – 9193, 2015).

Redukci hexasacharidu kyseliny hyaluronové modifikované na karboxylu jako methyl ester byla popsána v článku (Onoera K. a kol.: Agricultural and Biological Chem., 27, 2, 143-149, 1963). Jako činidlo bylo použito LiAlH_4 v tetrahydrofuranu.

I při redukcích karboxylových kyselin s hydridy na bázi hliníku je použití protických rozpouštědel nevhodné s ohledem na rychlou reakci aluminium hydridů s vodíkem rozpouštědla za vzniku molekulárního vodíku. Redukce probíhají efektivně v aprotických rozpouštědlech typu tetrahydrofuran, dichloromethan anebo acetonitril.

V článku (Montchamp J.-L. a kol.: Journal of the American Chemical Society, 114, 12, 4453, 1992) byla popsána redukce alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují také hydroxylové skupiny a ethery, pomocí aktivace karboxylu s triethyl ortoformiátem a 4-methylmorfolin-*N*-oxidem. Následná redukce byla uskutečněna pomocí NaBH_4 s oxidem osmičelým v ethanolu a vodě. Jako vedlejší produkt byla pozorována racemizace v poloze alfa karboxylu.

NaBH_4 byl použit na redukci široké škály karboxylových kyselin po *in situ* aktivaci s benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfátem. Reakce probíhá rychle v mírných podmínkách v tetrahydrofuranu s přidavkem *N,N*-diisopropylethylaminu za vzniku alkoholů s vysokým výtěžkem (McGeary R. P.: Tetrahedron Letters, 39, 3319-3322, 1998). Při redukci konjugované kyseliny, v tomto případě kyseliny skořicové, dochází k 18% redukci dvojné vazby.

Karboxylové skupiny tetrasacharidu esterifikované na methylestery, který obsahují i nechráněné hydroxylové skupiny, lze redukovat pomocí NaBH_4 v methanolu. Redukce na příslušný alkohol probíhá 1 hodinu při 20 °C (D'Acquarica I. a kol.: Tetrahedron, 58, 51, 10127 – 10136, 2002).

Podobný přístup byl popsán v článku (Stolz F. a kol.: European Journal of Organic Chemistry, 15, 3304 – 3312, 2004), kde byly alifatické karboxylové kyseliny obsahující také etherové

skupiny redukovány pomocí NaBH_4 po aktivaci karboxylu s 1,1'-karbonyldiimidazolem. Reakce byla uskutečněna v systému ethanol, dichlormethan, *N,N*-dimethylformamid.

5 Disacharid s volnými hydroxylovými skupinami a s cholesterolem vázaným na redukující konec O-glykosidickou vazbou byl redukován na karboxylu po jeho esterifikaci s diazomethanem v methanolu. Jako činidlo byl použit NaBH_4 a reakce probíhala 2 hodiny v methanolu při ambientní teplotě (Yoshikawa K. a kol.: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 46, 7, 1102 – 1107, 1998).

10 Směs oligosacharidů kyseliny hyaluronové byla esterifikována pomocí reakce s diazomethanem a následně byla redukována pomocí 0,2 až 20 ekvivalentů NaBH_4 ve vodě při 25 °C. Získaný materiál vykazoval stupeň substituce 5 až 50 % (Christner, J. E. a kol.: Biochemistry Journal, 167, 711-716, 1977).

15 Redukce methylesterů karboxylových kyselin v methanolu pomocí NaBH_4 probíhá za nižších teplot, pokud je do systému přidán katalytický methanolát sodný (Prasanth, C. P. a kol.: Journal of Organic Chemistry, 2018, 83, 1431-1440). Tímto způsobem je zabráněno rozkladu činidla vlivem kyselosti rozpouštědla.

20 Obecně lze konstatovat, že při redukcích karboxylových kyselin s hydridy na bázi boru je nutná aktivace karboxylu na jeho reaktivnější (elektrofilnější) derivát. Aktivace probíhá zpravidla v aprotických podmínkách a následná redukce s NaBH_4 probíhá většinou ve směsích s protickými rozpouštědly typu methanol, ethanol nebo voda. Jako redukované substráty byly použity i sloučeniny obsahující hydroxylové a amidické skupiny.

25 *Enzymatické redukce*

Alifatické karboxylové kyseliny s obsahem etherů a acetamidů lze redukovat ve vodě pomocí enzymu z *Gloeosporium olivarum* při 27 °C. Reakční čas 768 hodin je ale extrémně dlouhý, přičemž byla pozorována i racemizace alfa pozice redukováného karbonylu (Tsuda Y. a kol.: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 33, 5, 1955 – 1960, 1985).

35 Další enzym schopný redukovat alifatické karboxylové kyseliny s obsahem etherických skupin byl izolován z houby *Glomerella cingulata*. Tento enzym funguje při 27 °C ve vodě, reakční čas je až 624 hodin, přičemž byla pozorována i racemizace alfa pozice karbonylu (Tsuda Y. a kol.: Agricultural and Biological Chemistry, 48, 5, 1373 – 1374, 1984).

40 Je popsáno i použití enzymu z organismu *Glomerella cingulata*, kdy se použije s přidavkem KH_2PO_4 , MgSO_4 , peptonu a sacharózy, reakční čas je jenom 24 hodin ve vodě při 27 °C (Tsuda Y.: Chemical and pharmaceutical bulletin, 35, 6, 2554 – 2557, 1987).

Obecně lze konstatovat, že redukce lze provést i v mírných podmínkách ve vodě pomocí enzymu, avšak je nutné počítat s delším reakčním časem a taky s racemizací pozice alfa karbonylu.

45 *Redukce $\text{C}=\text{C}$ vazby nenasycených esterů karboxylových kyselin*

Redukce konjugované dvojné vazby byla popsána v publikaci (Falomi, M. a kol.: Tetrahedron Letters, 1999, 40, 4395-4396). V tomto případě probíhá aktivace nenasycené kyseliny kyanurchloridem v přítomnosti *N*-methylmorpholinu. Redukce intermediátu borohydridem sodným byla provedena ve vodě. Získaný materiál vykazoval 20 % nenasycených vazeb. Jako důvod redukce $\text{C}=\text{C}$ vazby je uvedeno bazické prostředí redukce.

55 Ještě vyšší podíl zredukované dvojné vazby byl popsán při redukcí pentafluorfenylesteru skořicové kyseliny v publikaci (Papavassilopoulou, E. a kol.: Tetrahedron Letters, 2007, 48, 8323-8325). Dvojná vazba byla zredukována z 25 %.

Enantioselektivní redukce -C=C- vazby nenasyceného esteru pomocí borohydridu sodného s přidavkem chloridu kobaltnatého a azabisoxazolinového ligandu ve směsi ethanol/diglym byla popsána v publikaci (Geiger, C. a kol.: *Adv. Synth. Catal.* 2005, 347, 249-254). V tomto případě nedochází k redukci karboxylové skupiny. Výťažky reakcí přesahovaly 80 %.

Redukce -C=C- vazby elektronově vysoce deficientních alkenů pomocí 3-butyl-1-methylimidazolinium borohydridu ve směsi acetonitril/voda (6:1) byla popsána v publikaci (Wang, J. a kol.: *Tetrahedron Letters*, 2008, 49, 6518-6520). Pro regeneraci činidla je používána aniontová metatize s borohydridem sodným. Redukce probíhá s vysokým výtěžkem 75 až 92 %.

Obecně lze konstatovat, že redukce konjugované dvojné vazby může probíhat za podmínek používaných pro redukci esterů. V některých případech může být tato reakce provedena záměrně, ovšem mnohdy není žádoucí.

Obecně lze konstatovat, že oligosacharidy dle strukturního vzorce I nebyly dosud popsány. Zmíněny byly pouze glykosidy s dvojnou vazbou v poloze 4 a 5 glukózového cyklu, dále polysacharidy s -C=C- dvojnou vazbou v poloze 4 a 5 glukosaminového cyklu, dále oligosacharidy s -C=C- dvojnou vazbou v poloze 4 a 5 koncového uronového cyklu, kde je vždy přítomná karboxylová skupina. Zmíněny byly ještě redukované nasycené oligosacharidy kyseliny hyaluronové, které ale neobsahují dvojnou vazbu a jejich stupeň substituce nepřesahuje 50 %.

Je překvapivé, že lze připravit nenasycené estery kyseliny hyaluronové štěpením polymeru v dimethylsulfoxidu v přítomnosti dusíkatých bází, protože oligosacharidy kyseliny hyaluronové v bazickém prostředí za zvýšené teploty podléhají rozkladu a odštěpují *N*-acetylglukosamin z redukujícího konce (Muckenschnabel, I. a kol.: *Cancer Letters*, 1998, 131, 13-20). Při použití směsi rozpouštědel DMSO/voda (příklad 8) nebo DMSO/methanol (příklad 9) je reakce výrazně zpomalena. Lze tedy konstatovat, že využití čistého DMSO je pro štěpení polymeru klíčové.

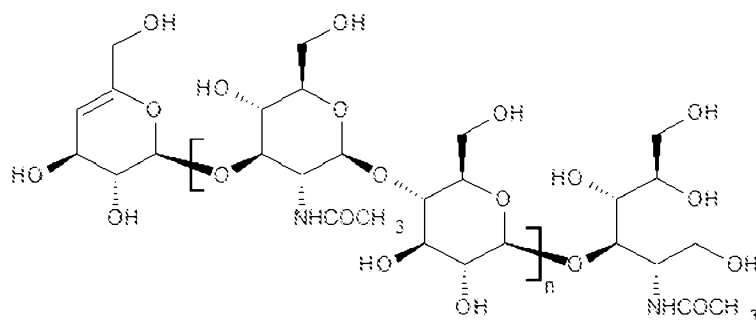
Dále je překvapivé, že redukce esterů kyseliny hyaluronové borohydridem sodným probíhá za mírných podmínek v protickém prostředí (voda nebo methanol), protože toto činidlo se v protickém prostředí se obecně nepoužívá (Smith, M. B. *MARCH'S ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY REACTIONS, MECHANISMS, AND STRUCTURE*, 7th ed.; Wiley: USA, 2013, strana 1500) kvůli jeho nízké reaktivitě a rozkladu za vzniku vodíku a borátových esterů.

Dále je překvapivé, že za těchto podmínek bylo dosaženo prakticky kvantitativní konverze při použití malého přebytku (4 ekvivalenty) borohydridu sodného oproti 50% stupni substituce (Christner, J. E. a kol.: *Biochemistry Journal*, 167, 711-716, 1997) při použití výrazně většího množství činidla (20 ekvivalentů) pro redukci methylesteru kyseliny hyaluronové.

Dále je překvapivé, že nedochází k redukci konjugované dvojné vazby (Falorni, M. a kol.: *Tetrahedron Letters*, 1999, 40, 4395-4396, McGeary R. P.: *Tetrahedron Letters*, 39, 3319-3322, 1998).

Podstata vynálezu

Vynález se týká nenasycených oligosacharidů složených ze střídajících se glukózových a *N*-acetylglukosaminových jednotek, s nenasycenou glukózovou jednotkou na neredukujícím konci a redukovaným anomerním koncem, podle strukturního vzorce I:



(I)

- kde $n = 0$ až 10 jednotek.

Takto modifikovaný oligosacharid vykazuje zvýšenou odolnost vůči enzymatické degradaci a negativně ovlivňuje růst některých linií rakovinových buněk.

Dále se vynález týká způsobu přípravy oligosacharidu podle strukturního vzorce I, kde se v prvním kroku alkyluje karboxylová skupina kyseliny hyaluronové na ester, ve druhém kroku se ester štěpí za vzniku dvojné vazby v polohách 4 a 5 cyklu a ve třetím kroku se redukuje esterové skupiny a koncové anomerní centrum. Oligosacharid podle strukturního vzorce I lze připravit i jiným způsobem podle vynálezu, a to tak, že se v prvním kroku enzymaticky štěpí kyselina hyaluronová pomocí lyázy na nenasycený oligosacharid za vzniku dvojné vazby v polohách 4 a 5 cyklu, ve druhém kroku se nenasycený oligosacharid alkyluje na ester a ve třetím kroku se redukuje esterové skupiny a koncové anomerní centrum za vzniku primárního alkoholu.

Pro přípravu oligosacharidu lze tedy použít následující dvě možnosti:

Možnost 1:

Vstupní materiál je kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti až 2000 kg.mol^{-1} , která se v prvním kroku alkyluje na karboxylové skupině za vzniku alkylesteru polymerního hyaluronanu, ve druhém kroku se uskuteční selektivní chemické štěpení alkylovaného polysacharidu za vzniku nenasyceného oligosacharidu a ve třetím kroku se uskuteční redukce esterů karboxylových kyselin a anomerního konce na primární alkoholy.

Možnost 2:

Vstupní materiál je kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti až 2000 kg.mol^{-1} , která se v prvním kroku enzymaticky štěpí za vzniku nenasycených oligosacharidů, pak se ve druhém kroku alkyluje na karboxylové skupině za vzniku alkylesterů oligosacharidů a ve třetím kroku se uskuteční redukce esterů karboxylových kyselin a anomerního konce na primární alkoholy.

Tyto dvě možnosti jsou detailněji rozebrány níže:

Možnost 1:

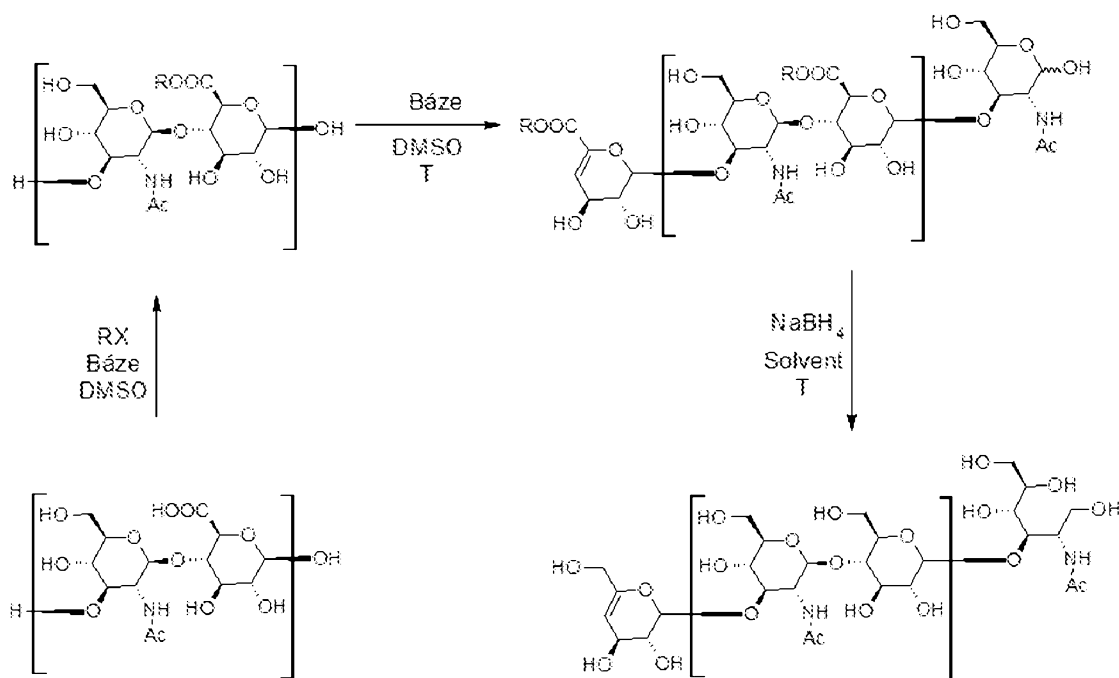
V prvním kroku se alkyluje karboxylová skupina polymerní kyseliny hyaluronové pomocí alkylačního činidla, například benzylbromidu, dimethylsulfátu nebo ethyljodidu, v dimethylsulfoxidu za přítomnosti báze, například diisopropylethylaminu nebo triethylaminu za vzniku alkylesteru. Tento krok probíhá s výhodou 20 až 120 hodin při teplotě 20 až 25 °C. Molární množství báze je s výhodou v rozmezí 1,7 až 6 ekvivalentů a molární množství alkylačního činidla je s výhodou v rozmezí 1,5 až 5 ekvivalentů vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové. Výchozí kyselina hyaluronová může mít molekulovou hmotnost v rozsahu 10 až

2000 kg.mol⁻¹. Koncentrace kyseliny hyaluronové v DMSO je s výhodou v rozmezí 0,3 až 10 % hmotn.

5 Ve druhém kroku se uskuteční selektivní chemické štěpení roztoku esterifikované kyseliny hyaluronové v DMSO při teplotě 20 až 80 °C, s výhodou se zahříváním, na 1 až 116 hodin, v přítomnosti báze, například triethylaminu, *N*-methylmorfolinu, nebo diisopropylethylaminu, s výhodou v rozmezí 2 až 20 ekvivalentů vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové.

10 Ve třetím kroku se uskuteční redukce esterů karboxylových kyselin a anomerního konce na primární alkoholy, a to s výhodou tak, že se do roztoku esterifikovaného oligosacharidu kyseliny hyaluronové ve vodě, v methanolu, v DMSO nebo ve směsi methanol/pyridin přidá borohydrid sodný (NaBH₄) v množství 1 až 20 ekvivalentů vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové a směs se míchá 1 až 140 hodin při teplotě 0 až 70 °C.

15 Je-li potřeba, převede se nativní kyselina hyaluronová před prvním krokem, alkylací, na formu rozpustnou v DMSO, například převedením na kyselou formu krokem okyselení s katexem, nebo převedením kyseliny hyaluronové na sůl s organickými protiionty (například tetrabutylammonium).



20

Schéma I - Možnost 1

kde R je C₁ - C₇ - lineární nebo rozvětvený nebo aromatický uhlovodík a X je halogenidový nebo sulfátový zbytek.

25

Možnost 2:

30 V prvním kroku se polymerní kyselina hyaluronová enzymaticky štěpí pomocí enzymu hyaluronan lyázy ve vodě při 36 až 38 °C po dobu 16 až 92 hodin za vzniku nenasyceného oligosacharidu. Výchozí kyselina hyaluronová může mít molekulovou hmotnost v rozsahu 100 až 2000 kg.mol⁻¹. Lyáza je s výhodou vybrána ze skupiny zahrnující *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyázu (SpHyl) a *Streptococcus pyogenes* hyaluronan lyázu (Hylp1) a aktivita lyázy je s výhodou v rozmezí 1,632 až 1,75 IU/ml. Štěpení může být úplné (až na disacharidy), s výhodou za použití SpHyl, nebo částečné (směs oligosacharidů).

35

Ve druhém kroku probíhá alkylace karboxylových skupin oligomerní kyseliny hyaluronové pomocí alkylačního činidla, například dimethylsulfátu, ethyljodidu nebo benzyl bromidu, v dimethylsulfoxidu za přítomnosti báze, například triethylaminu nebo diisopropyl-ethylaminu, za vzniku alkylesteru. Tento krok probíhá s výhodou 5 až 120 hodin při teplotě 20 až 25 °C, kde molární množství alkylačního činidla je s výhodou v rozmezí 1,2 až 3 ekvivalenty vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové a molární množství báze je s výhodou 1,2 až 3 molárního ekvivalentu vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové. Koncentrace roztoku oligomeru kyseliny hyaluronové v DMSO je s výhodou v rozmezí 5 až 30 % hmotn.

Ve třetím kroku se uskuteční redukce esterů karboxylových kyselin a anomerního konce na primární alkoholy, a to s výhodou tak, že se do roztoku esterifikovaného oligosacharidu kyseliny hyaluronové ve vodě, v methanolu, v DMSO nebo ve směsi methanol/pyridin přidá borohydrid sodný (NaBH_4) v množství 1 až 20 ekvivalentů vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové a směs se míchá 1 až 140 hodin při teplotě 0 až 70 °C.

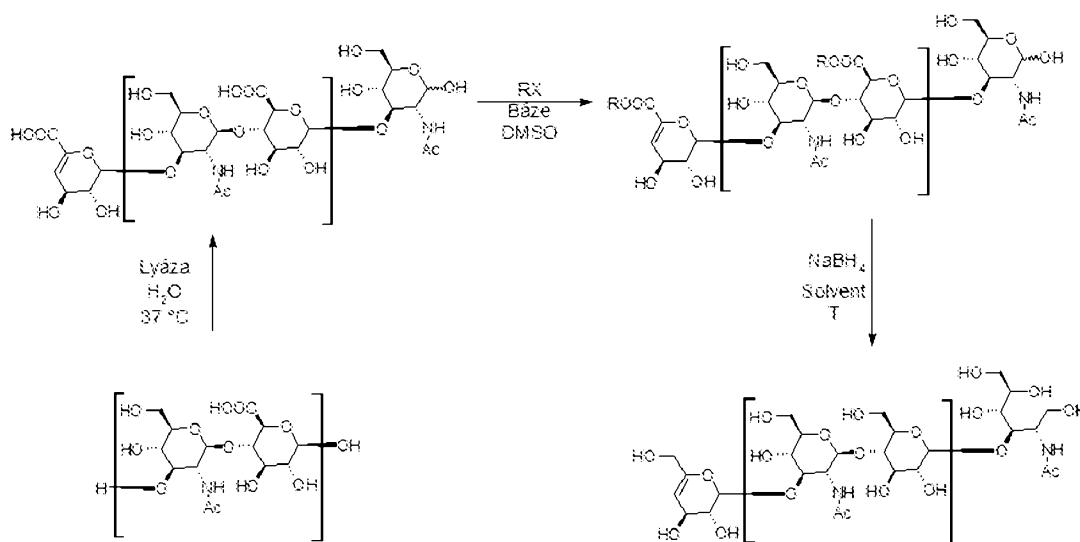


Schéma II – Možnost 2

kde R je C_1 až C_7 - lineární nebo rozvětvený nebo aromatický uhlovodík a X je halogenidový nebo sulfátový zbytek.

Dále se vynález týká použití oligosacharidů složených ze střídajících se glukózových a *N*-acetylglukosaminových jednotek, s nenasycenou glukózovou jednotkou na neredukujícím konci a redukovaným anomerním koncem podle strukturního vzorce (I). Tyto materiály negativně ovlivňují růst některých linií rakovinových buněk, a přitom nemají negativní vliv na růst buněk standardních. Dále vykazují vysokou odolnost vůči degradaci některými enzymy, což může zvýšit efektivitu jejich transportu a prodloužit dobu jejich účinku. Proto je lze využít v materiálech a kompozicích proti rakovině, například, ale nejen, ve formě roztoku pro intravenózní podání (cestou injekce nebo infuze), nebo ve formě pevné tablety pro orální podání. Nenasycený oligosacharid podle vynálezu tedy lze použít pro přípravu materiálů a kompozic s antirakovinným účinkem, s výhodou s antirakovinným účinkem proti kolorektálnímu karcinomu u lidí.

Objasnění výkresů

5 Obr. 1 – Porovnání rychlosti enzymatické degradace roztoku materiálu připraveného podle příkladu 36 (plná čára) s nativním oligomerem kyseliny hyaluronové (přerušovaná čára) po aplikaci enzymu *Streptococcus pneumoniae* hyaluronanlyázy (SpHyl).

10 Obr. 2 – Porovnání rychlosti enzymatické degradace roztoku materiálu připraveného podle příkladu 36 (plná čára) s nativním oligomerem kyseliny hyaluronové (přerušovaná čára) po aplikaci enzymu bovinní testikulární hyaluronanhydrolázy (BTH).

Obr. 3 – Vliv materiálů připravených podle příkladů 31, 33, 35 a 36 na viabilitu fibroblastů NHDF.

15 Obr. 4 – Vliv materiálů připravených podle příkladů 31, 33, 35 a 36 na viabilitu HT-29

Obr. 5 – Porovnání vlivu nativních nenasycených oligosacharidů HA a materiálů připravených podle příkladů 31, 33, 35 a 36 na viabilitu HT-29

20

Příklady uskutečnění vynálezu

Ac = acetyl

DMSO = dimethylsulfoxid

25 DS = stupeň substituce = $100 \% \cdot (\text{molární množství modifikované jednotky oligosacharidu}) / (\text{molární množství všech jednotek oligosacharidu})$

HA = kyselina hyaluronová

MeOH = methanol

Mw = molekulová hmotnost

30 NMR analýza = (700 MHz, D₂O/DMSO-d₆, δ ppm)

Hylp1 = *Streptococcus pyogenes* hyaluronan lyáza

SpHyl = *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyáza

DMEM = Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium

FBS = fetální bovinní sérum

35 IPA = isopropylalkohol

Zde používaný výraz ekvivalent (ekv) se vztahuje, není-li uvedeno jinak, na opakující se jednotku příslušného polysacharidu nebo oligosacharidu, například na disacharid kyseliny hyaluronové. Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak.
40 Molekulová hmotnost výchozích polysacharidů je hmotnostně střední stanovená pomocí metody SEC-MALLS.

Hodnota průměrné Mw byla zjišťována porovnáním integrálu signálu dvojně vazby při 6,2 ppm a integrálu signálů acetylových skupin při 2,0 ppm podle vzorce $Mw = 0,407 \cdot [I_{2,0}] / (3 \cdot [I_{6,2}])$
45 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$

Příklad 1

Alkylace kyseliny hyaluronové s ethyl jodidem

50

Roztok kyseliny hyaluronové (5,9 g, $Mw = 10 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) v demineralizované vodě (150 ml) byl ochlazen na 0 °C a míchán 2 hodiny s katexem (6 g) v H⁺ cyklu. Poté byl katex odfiltrován a roztok byl lyofilizován. Lyofilizát byl rozpuštěn v suchém DMSO (60 ml) pod dusíkovou atmosférou. Poté byl přidán triethylamin (4,8 ml, 2,2 ekv.) a ethyljodid (2,44 ml, 2 ekv) a reakční
55 směs byla míchána 20 hodin při 20 °C. Poté byl produkt vysrážen přidávkem ethylacetátu

(180 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 4,25-4,05 (m, 2H, CH_2); 1,75 (s, 3H, Ac); 1,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3). DS= 100 %.

Příklad 2

Alkylace kyseliny hyaluronové s dimethylsulfátem

Roztok kyseliny hyaluronové (1 g, $M_w = 2000 \text{ kg.mol}^{-1}$) v demineralizované vodě (200 ml) byl ochlazen na 0°C a míchán 2 hodiny s katexem (2 g) v H^+ cyklu. Poté byl katex odfiltrován a roztok byl lyofilizován. Lyofilizát byl rozpuštěn v suchém DMSO (300 ml) pod dusíkovou atmosférou. Poté byl přidán diisopropylethylamin (1,5 ml, 1,7 ekv) a dimethylsulfát (0,375 ml, 1,5 ekv.) a reakční směs byla míchána 120 hodin při 25°C . Poté byl produkt vysrážen přidávkem vody (200 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 3,75 (s, 3H, CH_2); 1,80 (s, 3H, Ac). DS= 98 %.

Příklad 3

Alkylace kyseliny hyaluronové s benzylbromidem

Roztok kyseliny hyaluronové (1 g, $M_w = 400 \text{ kg.mol}^{-1}$) v demineralizované vodě (100 ml) byl ochlazen na 0°C a míchán 2 hodiny s katexem (1 g) v H^+ cyklu. Poté byl katex odfiltrován a roztok byl lyofilizován. Lyofilizát byl rozpuštěn v suchém DMSO (10 ml) pod dusíkovou atmosférou. Poté byl přidán diisopropylethylamin (2,77 ml, 6 ekv) a benzylbromid (1,57 ml, 5 ekv.) a reakční směs byla míchána 90 hodin při 20°C . Poté byl produkt vysrážen přidávkem ethylacetátu (40 ml), promýván vodou a isopropylalkoholem a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 7,51-7,25 (m, 5H, Ar-H); 5,23 (d, $J = 12,55$ Hz, 1H, ArCH_2); 5,12 (d, $J = 12,55$ Hz, 1H, ArCH_2); 1,75 (s, 3H, Ac). DS = 100%.

Příklad 4

Alkylace kyseliny hyaluronové s ethyl jodidem

Roztok kyseliny hyaluronové (5,6 g, $M_w = 130 \text{ kg.mol}^{-1}$) v demineralizované vodě (160 ml) byl ochlazen na 0°C a míchán 2 hodiny s katexem (6 g) v H^+ cyklu. Poté byl katex odfiltrován a roztok byl lyofilizován. Lyofilizát byl rozpuštěn v suchém DMSO (60 ml) pod dusíkovou atmosférou. Poté byl přidán diisopropylethylamin (5,7 ml, 2,3 ekv) a ethyljodid (2,4 ml, 2,1 ekv) a reakční směs byla míchána 90 hodin při 20°C . Poté byl produkt vysrážen přidávkem ethylacetátu (240 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 4,25-4,05 (m, 2H, CH_2); 1,75 (s, 3H, Ac); 1,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3). DS= 100 %.

Příklad 5

Chemické štěpení ethylesterů kyseliny hyaluronové

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 1 (0,16 g) v suchém DMSO (7 ml) byl přidán triethylamin (1,14 ml, 20 ekv) a směs byla míchána při 20°C po dobu 16 hodin. Poté byl produkt sražen přidávkem ethylacetátu (28 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí NMR (DMSO-d_6): 5,92 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H, H-C=C); 4,25-4,05 (m, 2H, CH_2); 1,75 (s, 3H, Ac); 1,23 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3). Průměrná $M_w = 6,12 \text{ kg.mol}^{-1}$.

Příklad 6

Chemické štěpení methylesterů kyseliny hyaluronové

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 2 (0,5 g) v suchém DMSO (5 ml) byl přidán triethylamin (0,35 ml, 2 ekv) a směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 1 hodiny. Poté byl produkt sražen přidavkem ethylacetátu (20 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 5,95 (d, J = 3,9 Hz, 1H, H-C=C); 3,86 (s, 3H, CH₃); 1,75 (s, 3H, Ac). Průměrná M_w = 16,8 kg.mol⁻¹.

Příklad 7

Chemické štěpení benzylesterů kyseliny hyaluronové

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 3 (1 g) v suchém DMSO (10 ml) byl přidán triethylamin (1 ml, 3,4 ekv) a směs byla míchána při 50 °C po dobu 72 hodin. Poté byl produkt sražen přidavkem ethylacetátu (30 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí NMR (DMSO- d_6): 7,55-7,30 (m, 5H, Ar-H); 6,02 (d, J = 3,9 Hz, 1H, H-C=C); 5,26 – 5,28 (m, 2H, ArCH₂); 1,75 (s, 3H, Ac). Průměrná M_w = 2 kg.mol⁻¹.

Příklad 8

Chemické štěpení ethylesterů kyseliny hyaluronové ve směsi DMSO/voda

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 4 (0,5 g) ve směsi DMSO/voda (4:1, 5 ml) byl přidán triethylamin (0,5 ml, 3 ekv) a směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 72 hodin. Poté byl produkt sražen přidavkem ethylacetátu (20 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 5,92 (d, J = 3,9 Hz, 1H, H-C=C); 4,25-4,05 (m, 2H, CH₂); 1,75 (s, 3H, Ac); 1,23 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃). Průměrná M_w = 9,26 kg.mol⁻¹.

Příklad 9

Chemické štěpení ethylesterů kyseliny hyaluronové ve směsi DMSO/methanol

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 4 (0,2 g) ve směsi DMSO/methanol (4:1, 2 ml) byl přidán triethylamin (0,2 ml, 3 ekv) a směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 72 hodin. Poté byl produkt sražen přidavkem ethylacetátu (20 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 5,92 (d, J = 3,9 Hz, 1H, H-C=C); 4,25-4,05 (m, 2H, CH₂); 1,75 (s, 3H, Ac); 1,23 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃). Průměrná M_w = 3 kg.mol⁻¹.

Příklad 10

Chemické štěpení ethylesterů kyseliny hyaluronové

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 4 (1 g) v suchém DMSO (10 ml) byl přidán triethylamin (1 ml, 2,9 ekv) a směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 92 hodin. Poté byl produkt sražen přidavkem ethylacetátu (100 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D₂O) δ 6,25 (d, J = 4,2 Hz, 1H, H-C=C); 5,37-5,25 (m, 2H, CH₂); 2,10-1,98 (m, 3H, Ac); 1,35-1,23 (m, 3H, CH₃). Průměrná M_w = 1,2 kg.mol⁻¹.

Příklad 11

Chemické štěpení esterů kyseliny hyaluronové s chromatografickou separací

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 4 (1 g) v suchém DMSO (10 ml) byl přidán triethylamin (1 ml, 2,9 ekv) a směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 116 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,6 ml) a produkt byl separován na HPLC koloně s reverzní fází v systému voda/methanol. Po odpaření byly produkty analyzovány pomocí ^1H NMR (D₂O) δ 6,25 (d, J = 4,2 Hz, 1H, H-C=C); 5,37-5,25 (m, 2H, CH₂); 2,10-1,98 (m, 3H, Ac); 1,35-1,23 (m, 3H, CH₃).

Příklad 12

Chemické štěpení esterů kyseliny hyaluronové pomocí *N*-methylmorpholinu

5

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 4 (0,2 g) v suchém DMSO (2 ml) byl přidán *N*-methylmorpholin (0,35 ml, 6,5 ekv) a směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 112 hodin. Poté byl produkt sražen přidavkem ethylacetátu (20 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ 6,25 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H, H-C=C); 5,37-5,25 (m, 2H, CH₂); 2,10-1,98 (m, 3H, Ac); 1,35-1,23 (m, 3H, CH₃). Průměrná Mw = 5,5 kg.mol⁻¹.

10

Příklad 13

Chemické štěpení esterů kyseliny hyaluronové pomocí diisopropylethylaminu

15

Do roztoku alkylované HA připravené podle příkladu 4 (0,12 g) v suchém DMSO (7 ml) byl přidán diisopropylethylamin (0,2 ml, 3,8 ekv) a směs byla zahřívána na 50 °C po dobu 3 hodin. Poté byl produkt sražen přidavkem ethylacetátu (20 ml), promýván a sušen na vzduchu. Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ 6,25 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H, H-C=C); 5,37-5,25 (m, 2H, CH₂); 2,10-1,98 (m, 3H, Ac); 1,35-1,23 (m, 3H, CH₃). Průměrná Mw = 4 kg.mol⁻¹.

20

Příklad 14

Enzymatická degradace kyseliny hyaluronové s lyázou

25

Do roztoku nativní HA (5 g, 100 kg.mol⁻¹) v demineralizované vodě (250 ml) byl přidán roztok enzymu *Streptococcus pneumoniae* hyaluronanlyázy (0,25 ml, 408 IU, 50% v/v glycerol, 25 mM fosfátový pufr (Na_xH_yPO₄), 250 mM NaCl, pH=8). Roztok byl míchán při 36 °C přes noc (16 hodin). Poté byl přefiltrován přes 0,2 mm nylonový filtr a filtr byl promyt demineralizovanou vodou (50 ml). Roztok byl zakoncentrován na objem 100 ml a poté byl lyofilizován. Výsledný produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ 5,89 – 5,85 (m, 1H, H-C=C); 2,07 (s, 3H, Ac).

30

Příklad 15

Enzymatická degradace kyseliny hyaluronové s lyázou

35

Do roztoku nativní HA (1 g, 2000 kg.mol⁻¹) v octanovém pufru (200 ml, 50 mM CH₃COONa, 50 mM NaCl, pH = 6) byl přidán enzym Hylp1 (350 U). Roztok byl míchán při 38 °C po dobu 92 hodin. Poté byl vzorek převařen (100 °C), ochlazen, doplněn demineralizovanou vodou na objem 1 l a ultrafiltrován. Takto připravený roztok byl částečně odpařen a lyofilizován. Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ 5,86 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,39 – 3,33 (m, 3H, H-2); 2,10 – 2,00 (m, 12H, Ac). Průměrná Mw = 1,6 kg.mol⁻¹.

40

Příklad 16

45

Alkylace disacharidu kyseliny hyaluronové s ethyljodidem

Nenasycený disacharid, připravený podle příkladu 14 (0,4 g), byl rozpuštěn v suchém DMSO (1 ml). Poté byl přidán diisopropylethylamin (0,35 ml, 2 ekv) a ethyljodid (0,1 ml, 1,2 ekv) a reakční směs byla míchána při teplotě 20 °C po dobu 60 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,1 ml) a reakční směs byla dělena na C18 koloně ve směsi voda/methanol. Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ 6,27-6,25 (m, H-C=C, 1H); 4,33-4,27 (m, 2H, CH₂); 2,08 (2xs, 3H, Ac); 1,32, 1,31 (d x t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃). DS = 100 %

50

Příklad 17

Alkylace disacharidu kyseliny hyaluronové s ethyljodidem

5

Nenasycený disacharid, připravený podle příkladu 14 (0,4 g), byl rozpuštěn v suchém DMSO (1 ml). Poté byl přidán triethylamin (0,27 ml, 2 ekv.) a ethyljodid (0,24 ml, 3 ekv.) a reakční směs byla míchána při teplotě 25 °C po dobu 20 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,1 ml) a reakční směs byla dělena na C18 koloně ve směsi voda/methanol. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 6,27-6,25 (m, H-C=C, 1H); 4,33-4,27 (m, 2H, CH_2); 2,08 (2xs, 3H, Ac); 1,32, 1,31 (d x t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3). DS = 100 %.

10

Příklad 18

15 Alkylace disacharidu kyseliny hyaluronové s benzylbromidem

Nenasycený disacharid, připravený podle příkladu 14 (0,8 g) byl rozpuštěn v suchém DMSO (2 ml). Poté byl přidán diisopropylethylamin (0,7 ml, 2 ekv.) a benzylbromid (0,47 ml, 2 ekv.) a reakční směs byla míchána při teplotě 20 °C po dobu 16 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,2 ml) a reakční směs byla dělena na C18 koloně ve směsi voda/methanol. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 7,50-7,40 (m, 5H, Ar); 6,28-6,26 (m, 1H, H-C=C); 5,31 (s, 2H, ArCH_2); 2,07, 2,06 (2 x s, 3H, Ac). DS = 100 %. Výtěžek 0,76 g.

20

Příklad 19

25

Alkylace oligosacharidů kyseliny hyaluronové s benzylbromidem

Směs nenasycených oligosacharidů připravená podle příkladu 15 (0,1 g) byla rozpuštěna v suchém DMSO (1 ml). Poté byl přidán diisopropylethylamin (0,083 ml, 2 ekv.) a benzylbromid (0,06 ml, 2 ekv.) a reakční směs byla míchána při teplotě 25 °C po dobu 120 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,05 ml) a reakční směs byla dělena na C18 koloně ve směsi voda/methanol.

30

Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 7,60-7,37 (m, 20H, Ar); 6,28 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, H-C=C); 5,45-5,23 (m, 8H, ArCH_2); 2,10-1,94 (m, 12H, Ac). DS = 93 %. Výtěžek 0,07 g.

35

Příklad 20

Alkylace disacharidu kyseliny hyaluronové s dimethylsulfátem

Nenasycený disacharid, připravený podle příkladu 14 (0,2 g) byl rozpuštěn v suchém DMSO (1 ml). Poté byl přidán diisopropylethylamin (0,2 ml, 2 ekv.) a dimethylsulfát (0,1 ml, 2 ekv.) a reakční směs byla míchána při teplotě 20 °C po dobu 5 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,05 ml) a reakční směs byla dělena na C18 koloně ve směsi voda/methanol. Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 6,27-6,24 (m, 1H, H-C=C); 3,84 (2 x s, 3H, OCH_3); 2,07, 2,06 (2 x s, 3H, Ac). DS = 100 %. Výtěžek 0,21 g.

45

Příklad 21

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

50

Směs alkylovaných oligosacharidů (130 mg) připravená podle příkladu 10 byla rozpuštěna v DMSO (5 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (130 mg, 10,5 ekv.) a reakční směs byla zahřívána na 70 °C po dobu 140 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (5 ml, 20%) a směs byla míchána 30 minut. Poté byl produkt sražen přídavkem 2-propanolu (20 ml) a ethylacetátu (30 ml), promýván a sušen na vzduchu.

55

Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 ($5 \times \text{s}$, 15H, Ac). DS = 89 %.

5

Příklad 22

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

10 Směs alkylovaných oligosacharidů (252 mg) připravená podle příkladu 10 byla rozpuštěna v DMSO (5 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (243 mg, 10 ekv.) a reakční směs byla zahřívána na 50°C po dobu 140 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (7,5 ml, 20%) a směs byla míchána 30 minut. Poté byl produkt sražen přidavkem 2-propanolu (30 ml), promýván a sušen na vzduchu.

15 Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 5H, H-2); 2,09-2,03 ($7 \times \text{s}$, 21H, Ac). DS = 71 %.

Příklad 23

20

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

Směs alkylovaných oligosacharidů (101 mg) připravená podle příkladu 10 byla rozpuštěna v H_2O (1 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (22 mg, 2 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25°C po dobu 19 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,08 ml, 99%) a směs byla míchána 30 minut. Poté byl produkt sražen přidavkem 2-propanolu (10 ml), promýván a sušen na vzduchu.

25 Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 ($5 \times \text{s}$, 15H, Ac). DS = 62 %.

30

Příklad 24

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

35

Směs alkylovaných oligosacharidů (11 mg) připravená podle příkladu 10 byla rozpuštěna v H_2O (0,7 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (20 mg, 20 ekv.) a reakční směs byla míchána při 0°C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,02 ml, 99%) a směs byla míchána 30 minut. Poté byl produkt sražen přidavkem 2-propanolu (1 ml), promýván a sušen na vzduchu.

40

Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 ($5 \times \text{s}$, 15H, Ac). DS = 89 %.

45

Příklad 25

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

Směs alkylovaných oligosacharidů (12 mg) připravená podle příkladu 10 byla suspendována v MeOH-d_4 (0,7 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (13 mg, 12 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25°C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,01 ml, 99%). Sraženina byla filtrována a sušena na vzduchu.

50

Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 ($5 \times \text{s}$, 15H, Ac). DS = 100 %.

5 Příklad 26

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

10 Směs alkylovaných oligosacharidů (101 mg) připravená podle příkladu 10 byla suspendována v MeOH (2 ml). Roztok byl ochlazen na 0°C , byl přidán NaBH_4 (94 mg, 10 ekv.) a reakční směs byla míchána při 0°C po dobu 1 hodiny a poté při 25°C po dobu 15 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,1 ml, 99%) a směs byla míchána 30 minut. Poté byl produkt sražen přidávkem 2-propanolu (10 ml), promýván a sušen na vzduchu.

15 Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 ($5 \times \text{s}$, 15H, Ac). DS = 40 %.

Příklad 27

20

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

25 Směs alkylovaných oligosacharidů (11 mg) připravená podle příkladu 10 byla suspendována v sušeném MeOH (0,7 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (11 mg, 10 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25°C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,01 ml, 99%). Sraženina byla filtrována a sušena na vzduchu.

30 Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 ($5 \times \text{s}$, 15H, Ac). DS = 51 %.

Příklad 28

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

35

Směs alkylovaných oligosacharidů (98 mg) připravená podle příkladu 10 byla suspendována v MeOH (2 ml) a pyridinu (0,2 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (97 mg, 10 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25°C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,1 ml, 99%) a směs byla míchána 30 minut. Sraženina byla filtrována a sušena na vzduchu.

40

Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, $J = 9,4$ Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, $J = 9,1$ Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 ($5 \times \text{s}$, 15H, Ac). DS = 98 %.

45 Příklad 29

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

50 Směs alkylovaných oligosacharidů (19 mg) připravená podle příkladu 10 byla suspendována v MeOH (0,7 ml) a pyridinu (0,004 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (1,89 mg, 1 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25°C po dobu 20 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,1 ml, 99%) a MeOH (0,5 ml). Sraženina byla filtrována a sušena na vzduchu.

Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, J = 9,4 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, J = 9,1 Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 (5 $\times$ s, 15H, Ac). DS = 9 %.

5 Příklad 30

Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

10 Směs alkylovaných oligosacharidů (10 mg) připravená podle příkladu 10 byla suspendována v MeOH (0,7 ml) a pyridinu (0,008 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (4 mg, 4 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 18 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,01 ml, 99%) a MeOH (0,5 ml). Sraženina byla filtrována a sušena na vzduchu.

15 Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, J = 9,4 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, J = 9,1 Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 (5 $\times$ s, 15H, Ac). DS = 97 %.

Příklad 31

20 Redukce esterů oligomerů kyseliny hyaluronové

Směs alkylovaných oligosacharidů (200 mg) připravená podle příkladu 10 byla suspendována v MeOH (2 ml) a pyridinu (0,16 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (86 mg, 5 ekv.) a reakční směs byla míchána při 0 °C po dobu 20 minut a poté při 25 °C po dobu 18 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,125 ml, 99%) a MeOH (0,5 ml). Sraženina byla filtrována a sušena na vzduchu.

25 Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, J = 9,4 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, J = 9,1 Hz, 8,0 Hz, 3H, H-2); 2,09-2,03 (5 $\times$ s, 15H, Ac). DS = 98 %.

30

Příklad 32

Redukce esterů izolovaného disacharidu kyseliny hyaluronové

35 Izolovaný alkylovaný disacharid (103 mg) připravený podle příkladu 16 byl suspendován v MeOH (2 ml) a pyridinu (0,08 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (38 mg, 4 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,15 ml, 99%) a 2-propanol (5 ml). Sraženina byla centrifugována, promývána a sušena na vzduchu.

40 Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ = 5,10 (d, J = 4,08 Hz, 1H, H-C=C); 2,06 (s, 3H, Ac). DS = 95 %.

Příklad 33

45 Redukce esterů izolovaného tetrasacharidu kyseliny hyaluronové

Izolovaný alkylovaný tetrasacharid (203 mg) připravený podle příkladu 11 byl suspendován v MeOH (4 ml) a pyridinu (0,16 ml). Dále byl přidán NaBH_4 (76 mg, 4 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,15 ml, 99%) a 2-propanol (5 ml). Sraženina byla centrifugována, promývána a sušena na vzduchu.

50

Produkt byl analyzován pomocí ^1H NMR (D_2O) δ 5,13 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, J = 9,4 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 2,09-2,03 (2 $\times$ s, 6H, Ac). DS = 100 %.

55

Příklad 34

Redukce esterů izolovaného hexasacharidu kyseliny hyaluronové

- 5 Izolovaný alkylovaný hexasacharid (204 mg) připravený podle příkladu 11 byl suspendován v MeOH (4 ml) a pyridinu (0,16 ml). Dále byl přidán NaBH₄ (81 mg, 4 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,15 ml, 99%) a 2-propanol (5 ml). Sraženina byla centrifugována, promývána a sušena na vzduchu.
- 10 Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ 5,13 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, J = 9,4 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, J = 9,1 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 2,09-2,03 (3 x s, 9H, Ac). DS = 100 %.

Příklad 35

15

Redukce esterů izolovaného oktasacharidu kyseliny hyaluronové

- Izolovaný alkylovaný oktasacharid (203 mg) připravený podle příkladu 11 byl suspendován v MeOH (4 ml) a pyridinu (0,16 ml). Dále byl přidán NaBH₄ (76 mg, 4 ekv.) a reakční směs byla
- 20 míchána při 25 °C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,15 ml, 99%) a 2-propanol (5 ml). Sraženina byla centrifugována, promývána a sušena na vzduchu.

- Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ 5,13 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, J = 9,4 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, J = 9,1 Hz, 8,0 Hz, 2H, H-2); 2,09-2,03 (5 x s, 12H, Ac). DS = 100 %.
- 25

Příklad 36

Redukce směsi esterů vyšších sacharidů kyseliny hyaluronové

30

- Směs esterů vyšších sacharidů (200 mg, 10-20 sacharidy) připravená podle příkladu 11 byla suspendována v MeOH (4 ml) a pyridinu (0,16 ml). Dále byl přidán NaBH₄ (76 mg, 4 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,15 ml, 99%) a 2-propanol (5 ml). Sraženina byla centrifugována, promývána a sušena na
- 35 vzduchu.

- Produkt byl analyzován pomocí NMR, ¹H NMR (D₂O) δ 5,13 (d, J = 4,7 Hz, 1H, H-1); 5,09 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-C=C); 3,38 (dd, J = 9,4 Hz, 8,0 Hz, 1H, H-2); 3,32 (dd, J = 9,1 Hz, 8,0 Hz, 4H, H-2); 2,09-2,03 (m, 18H, Ac). DS = 100 %.
- 40

Příklad 37

Redukce benzylosteru izolovaného disacharidu kyseliny hyaluronové

- 45 Benzylovaný disacharid (59 mg) připravený podle příkladu 18 byl rozpuštěn v MeOH (1 ml) a pyridinu (0,04 ml). Dále byl přidán NaBH₄ (18 mg, 4 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,04 ml, 99%) a 2-propanol (4 ml). Sraženina byla centrifugována, promývána a sušena na vzduchu.

- 50 Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ = 5,10 (d, J = 4,08 Hz, 1H, H-C=C); 2,06 (s, 3H, Ac). Konverze 95 %.

Příklad 38

- 55 Redukce methylesteru izolovaného disacharidu kyseliny hyaluronové

Methylovaný disacharid (56 mg) připravený podle příkladu 20 byl rozpuštěn v MeOH (1 ml) a pyridinu (0,04 ml). Dále byl přidán NaBH₄ (19 mg, 3,5 ekv.) a reakční směs byla míchána při 25 °C po dobu 2 hodin. Poté byla přidána kyselina octová (0,04 ml, 99%) a 2-propanol (4 ml).
 5 Sraženina byla centrifugována, promývána a sušena na vzduchu.

Produkt byl analyzován pomocí ¹H NMR (D₂O) δ = 5,10 (d, *J* = 4,08 Hz, 1H, H-C=C); 2,06 (s, 3H, Ac). Konverze = 89 %.

10 Příklad 39

Porovnání enzymatické degradace redukováného oligomeru HA připraveného podle příkladu 36 s nativním oligomerem HA10.

15 8 mg nativního nebo redukováného oligosacharidu HA připraveného podle příkladu 36 bylo rozpuštěno v 0,8 ml roztoku obsahujícího 0,01 mol.L⁻¹ octanového pufru a 0,01 mol.L⁻¹ NaCl v D₂O. Pak byla přidána kyselina octová na dosažení pH 5,3. Do této směsi bylo přidáno 800 jednotek enzymu BTH a směs se míchala 24 hodin při 37 °C. Finální roztok pak byl ochlazen na 20 °C a změřen na NMR. Hodnota průměrné molekulové hmotnosti oligosacharidu byla
 20 vypočtena na základě poměru integrálu signálů vodíků anomerního konce při 5,16 ppm a integrálu vodíků -CH₃ skupiny při 2,0 ppm.

Příklad 40

25 Porovnání enzymatické degradace redukováného oligomeru HA připraveného podle příkladu 36 s nativním oligomerem HA10.

8 mg nativního nebo redukováného oligosacharidu HA připraveného podle příkladu 36 bylo rozpuštěno v 0,5 ml D₂O a poté byl přidán roztok enzymu *Streptococcus pneumonia* hyaluronan
 30 lyázy (0,005 ml, 8 IU, 50% v/v glycerol, 25 mM fosfátový pufr (Na_xH_yPO₄), 250 mM NaCl, pH = 8). Roztok byl míchán 24 hodin při 37 °C přes noc (16 hodin). Finální roztok pak byl ochlazen na 20 °C, zředěn D₂O (0,2 ml) a změřen na NMR. Rozsah štěpení byl určen podle integrálu signálů vodíků vznikající dvojné vazby při 5,06 ppm a integrálu vodíků -CH₃ skupiny
 při 2,0 ppm.

35

Příklad 41

Testování vlivu redukováného oligosacharidu kyseliny hyaluronové připraveného podle příkladů 31, 33, 35, 36 na viabilitu NHDF fibroblastů.

40

Lidské fibroblasty NHDF byly kultivované v DMEM médiu s obsahem 10% FBS (5% CO₂, 37 °C). Cytotoxicita byla měřena prostřednictvím MTT testu. Po dosažení 80% konfluence byly buňky zpasážované a vyseté na 96-jamkovou desku v hustotě 5000 buněk na jamku. Po inkubaci do druhého dne bylo kultivační médium vyměněno za testované vzorky (CTRL = kultivační
 45 médium). Po 24, 48 a 72 hodinách od treatmentu buněk bylo přidáno 20 μl MTT (5 mg/ml) a následovala 2,5 hodinová inkubace. Na závěr bylo kultivační médium se vzorky z destičky vyklepnuto a byl přidán lyzační roztok (IPA: DMSO (1:1), Triton X-100 (10%)). Po zlyzování buněk byla měřena absorbance na spektrometru Ensight (Perkin Elmer) při vlnové délce 570 nm, (690 nm pozadí).

50

Graf Změna viability NHDF (obr. 3) vyjadřuje změnu viability buněk vztaženou ke kontrole v daném čase – tedy neovlivněná kontrola odpovídá hodnotě 0; pokud je hodnota kladná nebo záporná max. do -20 %, interpretuje se to tak, že látka nemá cytotoxický efekt.

Příklad 42

5 Testování vlivu redukovaných oligosacharidů kyseliny hyaluronové připravených podle příkladů 31, 33, 35 a 36 na viabilitu HT-29

10 Lidské buňky kolorektálního karcinomu HT-29 byly kultivované v DMEM médiu s obsahem 10% FBS (5% CO₂, 37 °C). Cytotoxicita byla měřena prostřednictvím MTT testu. Po dosažení 80% konfluence byly buňky zpasážované a vyseté na 96-jamkovou desku v hustotě 3000 buněk na jamku. Po inkubaci do druhého dne bylo kultivační médium vyměněno za testované vzorky (CTRL = kultivační médium). Po 24, 48 a 72 hodinách od treatmentu buněk bylo přidáno 20 µl MTT (5 mg/ml) a následovala 2,5 hodinová inkubace. Na závěr bylo kultivační médium se vzorky z destičky vyklepnuto a byl přidán lyzační roztok (IPA: DMSO (1:1), Triton X-100 (10%). Po zlyzování buněk byla měřena absorbance na spektrometru Ensight (Perkin Elmer) při vlnové délce 570 nm, (690 nm pozadí).

20 Graf Změna viability HT-29 (obr. 4) vyjadřuje změnu viability buněk vztaženou ke kontrole v daném čase – tedy neovlivněná kontrola odpovídá hodnotě 0; pokud je hodnota kladná nebo záporná max. do -20 %, interpretuje se to tak, že látka nemá cytotoxický efekt.

Příklad 43

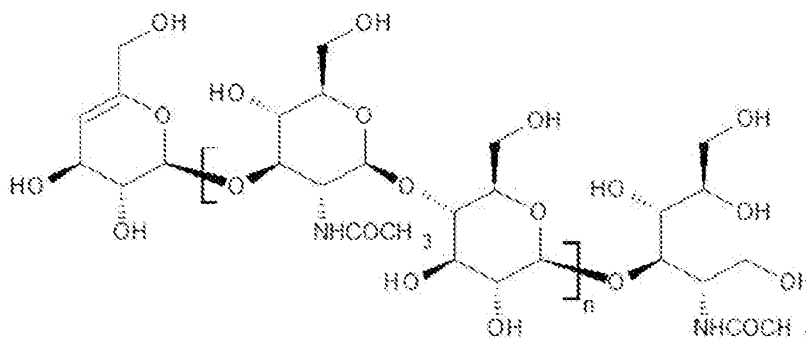
25 Porovnání vlivu nativních nenasycených oligosacharidů kyseliny hyaluronové a derivátů připravených podle příkladů 31, 33, 35 a 36 na viabilitu HT-29

30 Lidské buňky kolorektálního karcinomu HT-29 byly kultivované v DMEM médiu s obsahem 10% FBS (5% CO₂, 37 °C). Cytotoxicita byla měřena prostřednictvím MTT testu. Po dosažení 80% konfluence byly buňky zpasážované a vyseté na 96-jamkovou desku v hustotě 3000 buněk na jamku. Po inkubaci do druhého dne bylo kultivační médium vyměněno za testované vzorky (CTRL = kultivační médium). Po 72 hodinách od treatmentu buněk bylo přidáno 20 µl MTT (5 mg/ml) a následovala 2,5 hodinová inkubace. Na závěr bylo kultivační médium se vzorky z destičky vyklepnuto a byl přidán lyzační roztok (IPA: DMSO (1:1), Triton X-100 (10%). Po zlyzování buněk byla měřena absorbance na spektrometru Ensight (Perkin Elmer) při vlnové délce 570 nm, (690 nm pozadí).

35 Graf Změna viability HT-29 (obr. 5) vyjadřuje změnu viability buněk vztaženou ke kontrole v daném čase – tedy neovlivněná kontrola odpovídá hodnotě 0; pokud je hodnota kladná nebo záporná max. do -20 %, interpretuje se to tak, že látka nemá cytotoxický efekt.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nenasycený oligosacharid strukturního vzorce I,



(I)

kde $n = 0$ až 10.

2. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se v prvním kroku alkyluje karboxylová skupina kyseliny hyaluronové na ester, ve druhém kroku se ester štěpí za vzniku dvojné vazby v polohách 4 a 5 cyklu a ve třetím kroku se redukuje esterové skupiny a koncové anomerní centrum.

3. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že v prvním kroku se připraví roztok kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti v rozmezí 10 až 2000 kg.mol⁻¹ v DMSO, kde koncentrace roztoku je v rozmezí 0,3 až 10 % hmotn., pak se přidá báze v množství 1,7 až 6 molárního ekvivalentu vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové, pak se přidá alkylační činidlo v množství 1,5 až 5 molárního ekvivalentu vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové a směs se nechá reagovat 20 až 120 hodin při teplotě 20 až 25 °C za vzniku esterifikované kyseliny hyaluronové.

4. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 2 nebo 3, **vyznačující se tím**, že báze je vybrána ze skupiny zahrnující diisopropylethylamin a triethylamin.

5. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle kteréhokoli z nároků 2 až 4, **vyznačující se tím**, že alkylační činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující benzylbromid, dimethylsulfát a ethyljodid.

6. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle kteréhokoli z nároků 2 až 5, **vyznačující se tím**, že ve druhém kroku se uskuteční selektivní chemické štěpení esterifikované kyseliny hyaluronové v dimethylsulfoxidu při teplotě 20 až 80 °C po dobu 1 až 116 hodin, v přítomnosti báze v rozmezí 2 až 20 ekvivalentů vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové.

7. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že báze ve druhém kroku je vybrána ze skupiny zahrnující triethylamin, N-methylmorfolin a diisopropylethylamin.

8. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se v prvním kroku enzymaticky štěpí kyselina hyaluronová pomocí lyázy na nenasycený oligosacharid za vzniku dvojné vazby v polohách 4 a 5 cyklu, ve druhém kroku se nenasycený oligosacharid alkyluje na ester a ve třetím kroku se redukuje esterové skupiny a koncové anomerní centrum za vzniku primárního alkoholu.

9. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že molekulová hmotnosti výchozí kyseliny hyaluronové je v rozmezí 100 až 2000 kg.mol⁻¹, lyáza je vybrána ze skupiny zahrnující *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyázu a *Streptococcus pyogenes* hyaluronan lyázu a že štěpení probíhá ve vodě a s aktivitou lyázy v rozmezí 1,632 až 1,75 IU/ml při teplotě v rozmezí 36 až 38 °C a po dobu 16 až 92 hodin, za vzniku nenasyceného oligosacharidu vzorce I.

10. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 8 nebo 9, **vyznačující se tím**, že se ve druhém kroku připraví roztok nenasyceného oligomeru kyseliny hyaluronové v DMSO, kde koncentrace roztoku je v rozmezí 5 až 30 % hmotn., pak se přidá báze v množství 1,2 až 3 molárního ekvivalentu vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové, pak se přidá alkylační činidlo v množství 1,2 až 3 molárního ekvivalentu vzhledem k disacharidu kyselině hyaluronové a směs se nechá reagovat 5 až 120 hodin při teplotě 20 až 25 °C za vzniku esterifikovaného oligosacharidu kyseliny hyaluronové.

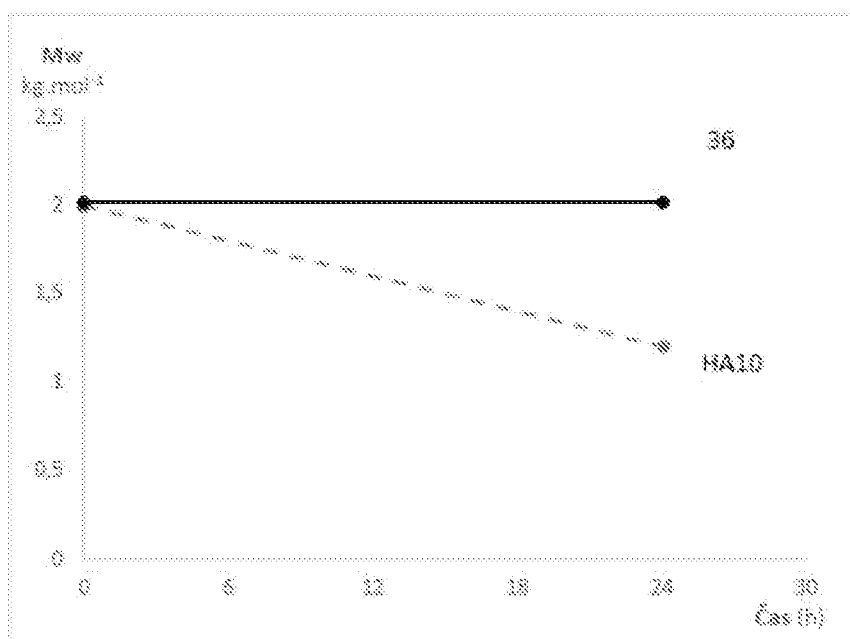
11. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že báze je vybrána ze skupiny zahrnující triethylamin a diisopropylethylamin a/nebo alkylační činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující benzylbromid, dimethylsulfát a ethyljodid.

12. Způsob přípravy nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle kteréhokoli z nároků 2 až 11, **vyznačující se tím**, že se ve třetím kroku do roztoku esterifikovaného oligosacharidu kyseliny hyaluronové ve vodě, v DMSO, v methanolu nebo ve směsi methanol/pyridin přidá borohydrid sodný - NaBH₄ - v množství 1 až 20 molárních ekvivalentů vzhledem k disacharidu kyseliny hyaluronové při teplotě 0 až 70 °C a směs se míchá 1 až 140 hodin.

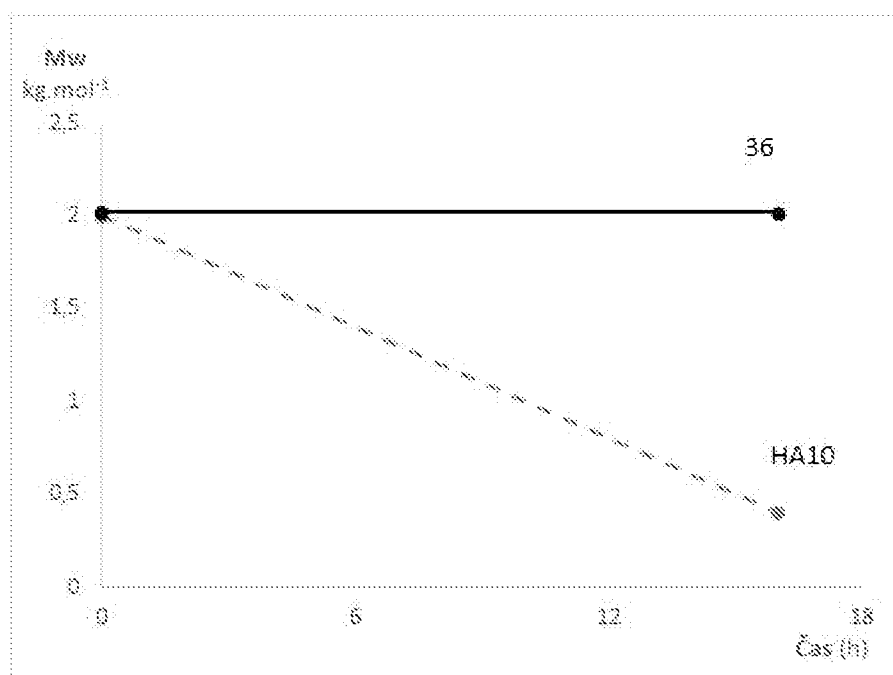
13. Použití nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčbu rakoviny.

14. Použití nenasyceného oligosacharidu vzorce I podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčbu kolorektálního karcinomu u lidí.

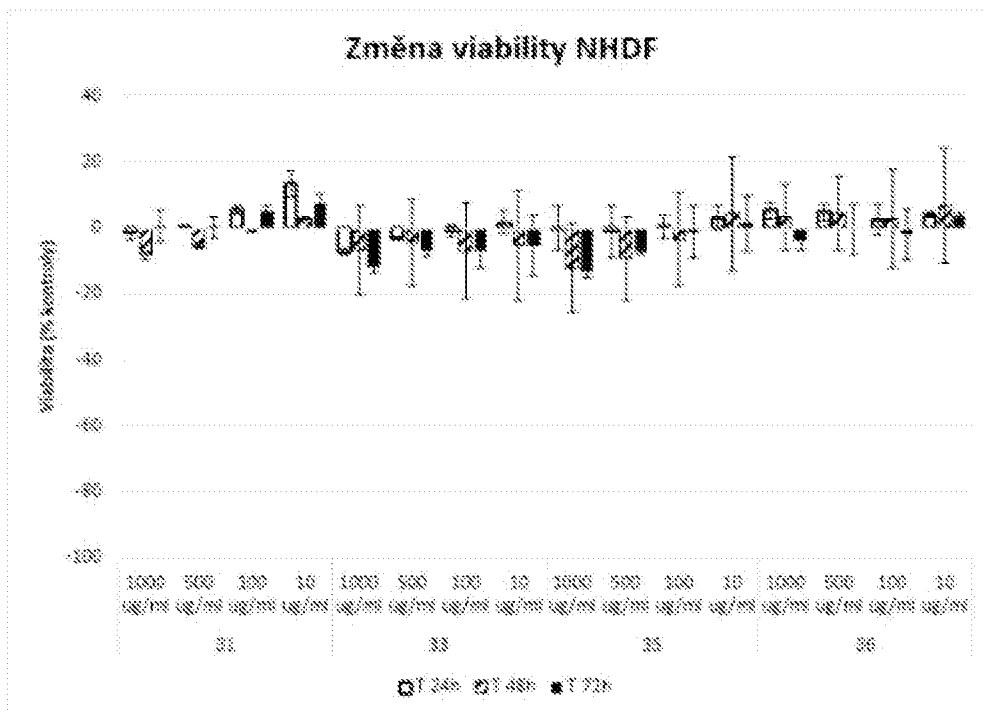
3 výkresy



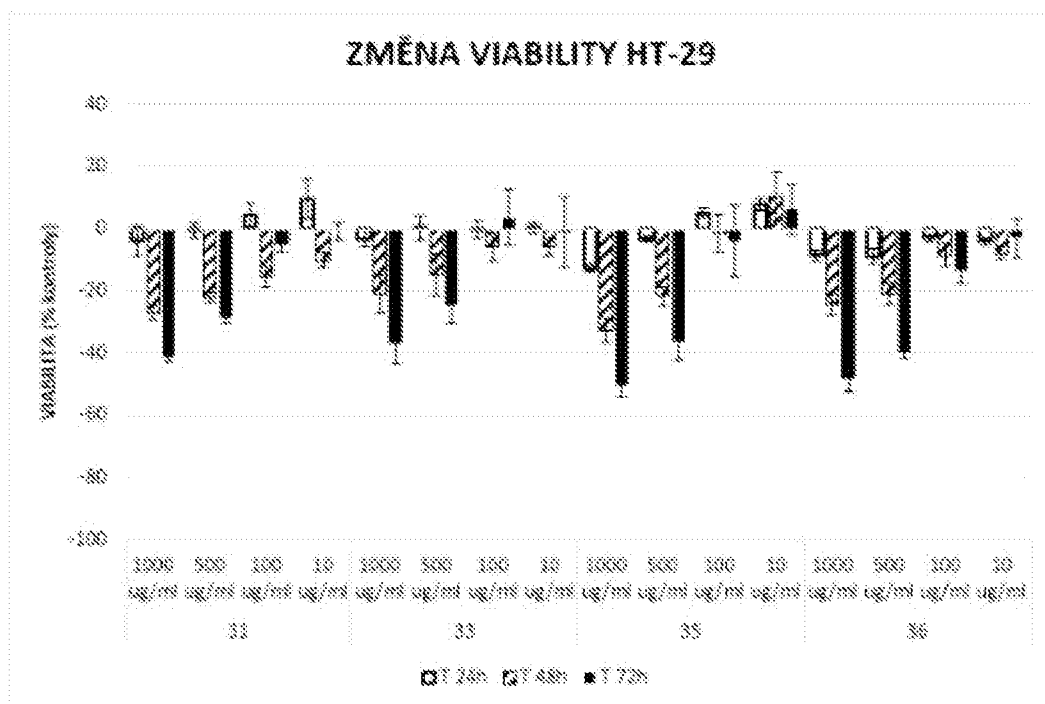
Obr. 1



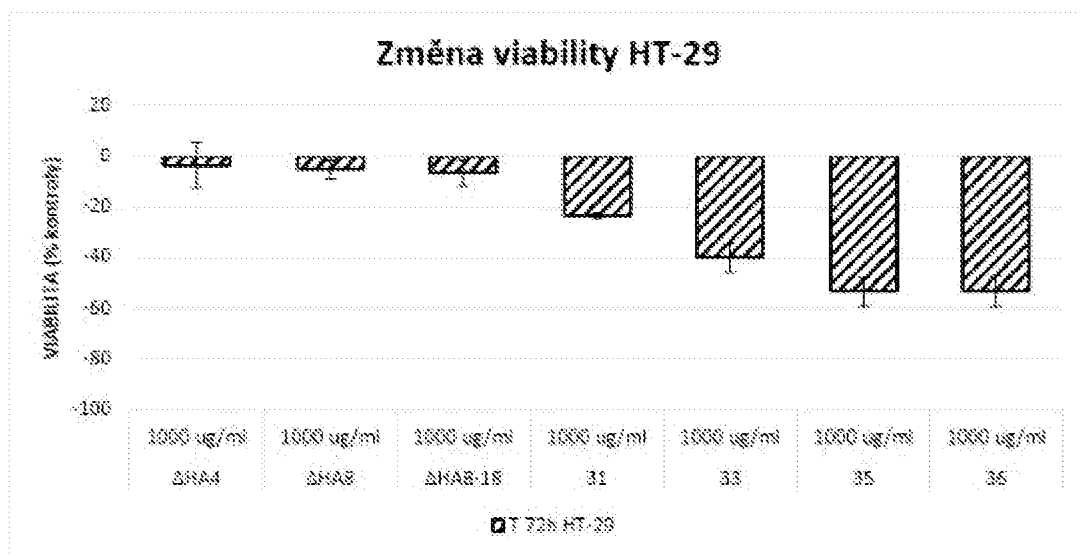
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5