

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 106

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-375**
(22) Přihlášeno: **27.06.2016**
(40) Zveřejněno: **03.01.2018**
(Věstník č. 1/2018)
(47) Uděleno: **27.11.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **08.01.2020**
(Věstník č. 2/2020)

(56) Relevantní dokumenty:

J.G. Beeley: "Laboratory Techniques" in Biochemistry and Molecular Biology (P.H.Burdon, O.H. Knippenberg Eds.), Elsevier, Amsterdam 1985;
R.D. Guthrie et al. Carbohydrate chemistry - A Specialist Periodical Report, The Chemical Society, London 1969 (SBN 85156 012 5); I. Cumpstey: "Chemical Modification of Polysaccharides" Hindawi Publishing Corporation, ISRN Organic Chemistry, Vol. 2013, Article ID 417672, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/417672>; A.V.Kühn et al.: "Behaviour of 4,5-unsaturated hyaluronic acid oligosaccharides under electrospray ionisation" Rapid Communication in Mass Spectrometry 18, 733-734 (2004).
WO 2011/069474 A2; WO 2014/023272 A1.

(73) Majitel patentu:

Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:

Mgr. Radovan Buffa, Ph.D., Humenné, SK
Ing. Tomáš Bobula, Ph.D., Svít, SK
Ing. Petra Šedová, Ph.D., Česká Třebová, CZ
Bc. Ivana Basarabová, Medzilaborce, SK
Pavlína Procházková, Vlkoš, CZ
Hana Vágnerová, Dolní Čermná, CZ
Iva Dolečková, Hradec Králové, CZ
Soňa Moravčíková, Jamné nad Orlicí, CZ
RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:

KANIA, SEDLÁK, SMOLA, Ing. Lucie
Lunzarová, Mendlovo náměstí 1a, 603 00 Brno

(54) Název vynálezu:

Nenasycené deriváty polysacharidů, způsob jejich přípravy a jejich použití

(57) Anotace:

Řešení se týká přípravy nových derivátů polysacharidů s dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 pyranozového cyklu. Postup přípravy je založen na oxidaci OH skupiny v poloze 6 na aldehyd, následné eliminaci za vzniku dvojné $C=C$ vazby v polohách 4 a 5 a finální redukci aldehydicke skupiny v poloze 6 na původní alkohol. Takové deriváty polysacharidů vykazují zvýšenou antioxidační aktivitu a některé z nich i selektivní negativní vliv na viabilitu rakovinových buněk.



x

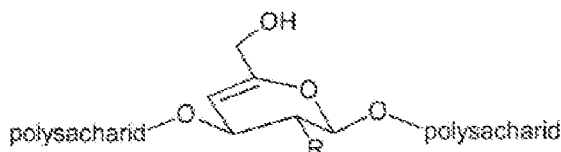
kde R = -CH₂ nebo -NH-CH₂-CH₂-

CZ 308106 B6

Nenasycené deriváty polysacharidů, způsob jejich přípravy a jejich použití

Oblast techniky

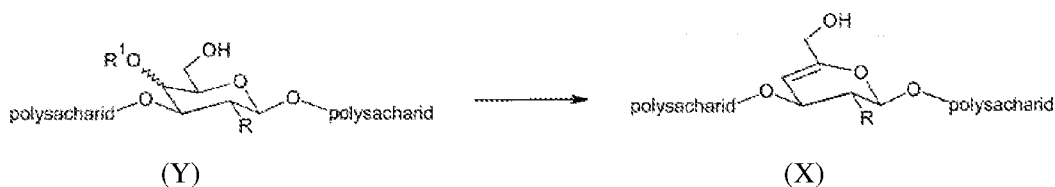
Vynález se týká derivátů polysacharidů, obsahujících ve struktuře heterocyklus s dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 podle strukturního vzorce X,



(X),

kde R je skupina --NH--CO--CH_3 nebo --OH .

Dále se vynález týká přípravy derivátů podle vzorce X z výchozího polysacharidu obsahujícího strukturní fragment Y, kde samotná modifikace pak může být zjednodušeně popsána následujícím schématem:



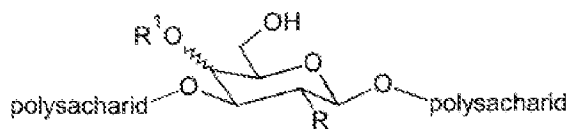
kde R je skupina --NH--CO--CH_3 nebo --OH , a R^1 je skupina $\text{--SO}_2\text{--ONa}$, $\text{--SO}_2\text{--OH}$, nebo --H , přičemž absolutní konfigurace na uhlíku 4 může být R nebo S.

Dále se vynález týká použití těchto nenasycených derivátů, které oproti nativním polysacharidům vykazují zvýšené antioxidační vlastnosti a některé z nich selektivně inhibují růst rakovinových buněk.

Dosavadní stav techniky

Polysacharidy obecného vzorce Y

Polysacharidy mají v organismech širokou škálu funkcí, například stavební, zásobní nebo i regulační. Mezi polymery přirozeně se vyskytující v organismech patří i polysacharidy obecného vzorce Y

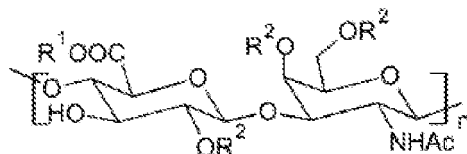


(Y),

kde R je skupina $\text{CH}_3\text{--CO--NH--}$ nebo --OH , a R^1 je skupina $\text{--SO}_2\text{--ONa}$, $\text{--SO}_2\text{--OH}$, nebo --H . Sem patří například chondroitin sulfát, dermatan sulfát, karagenan, keratan sulfát nebo kyselina hyaluronová.

Chondroitin sulfát je lineární, sulfatovaný a negativně-nabíý glykosaminoglykan složený z opakujících se monomerních jednotek *N*-acetyl-D-galaktosaminu a D-glukuronové kyseliny vzájemně propojených $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glykosidickými vazbami (strukturní vzorec chondroitin sulfátu viz níže),

5



kde

10 R^1 je -H nebo -Na,

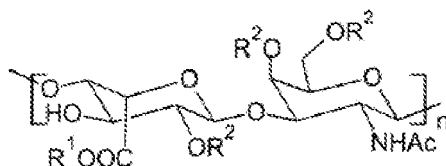
R^2 je -H, $-\text{SO}_2\text{-ONa}$ nebo $-\text{SO}_2\text{-OH}$.

Zdrojem chondroitin sulfátu jsou živočišné pojivové tkáně, kde se váže na proteiny a tvoří tak součást proteoglykanů. Sulfatace chondroitinu se uskutečňuje pomocí sulfotransferáz v různých polohách a různém zastoupení. Jedinečný vzorec sulfatace jednotlivých poloh v polymerním řetězci kóduje specifickou biologickou aktivitu chondroitin sulfátu. Chondroitin sulfát je důležitým stavebním blokem chrupavky v kloubech, kterým dodává odolnost v tlaku a obnovuje rovnováhu ve složení kloubového maziva (Baeurle S. A. a kol. *Polymer* 50, 1805, 2009).

20

Dermatan sulfát je lineární, sulfatovaný a negativně-nabíý glykosaminoglykan složený z opakujících se monomerních jednotek *N*-acetyl-D-galaktosaminu a L-iduronové kyseliny vzájemně propojených $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glykosidickými vazbami (strukturní vzorec dermatan sulfátu viz níže),

25



kde

30 R^1 je -H nebo -Na,

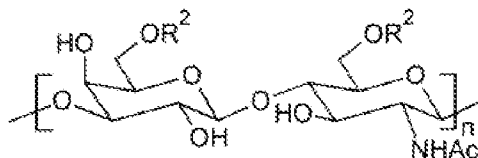
R^2 je -H, $-\text{SO}_2\text{-OH}$, nebo $-\text{SO}_2\text{-ONa}$

Dermatan sulfát se od chondroitin sulfátu odlišuje přítomností L-iduronové kyseliny, která je C-5 epimerem D-glukuronové kyseliny. Opačná konfigurace iduronové kyseliny umožňuje lepší flexibilitu řetězců dermatan sulfátu a zabezpečuje jejich specifickou glykosaminoglykan-proteinovou interakci v okolním prostoru. Tyto interakce přispívají k regulaci vícero buněčných procesů, jako např. migraci, proliferaci, diferenciaci nebo angiogenezi. Proměna chondroitin sulfátu na dermatan sulfát je zabezpečena pomocí tří enzymů, a to dermatan sulfát epimerázy 1 (DS-epi1), dermatan sulfát epimerázy 2 (DS-epi2) a dermatan 4-*O*-sulfotransferázy (D4ST1) (Thelin M., a kol. *FEBS Journal* 280, 2431, 2013).

40

Keratan sulfát patří do skupiny lineárních sulfatovaných polysacharidů obsahující D-galaktózu, *N*-acetylglukosamin a galaktóza-6-sulfát spojených vazbami $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$, který se

stavbou a vazbami podobá chondroitin sulfátu. Nachází se v rohovce, chrupavkách, kostech a pojivové tkáni (strukturní vzorec keratan sulfátu viz níže),



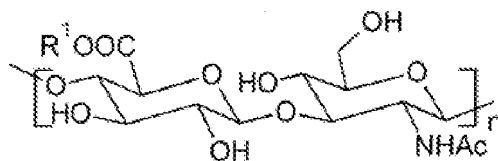
5

kde R^2 je $-H$, $-SO_2-OH$, nebo $-SO_2-ONa$

Karagenany patří do skupiny lineárních sulfatovaných polysacharidů, které se získávají extrakcí z červených mořských řas. Základními stavebními jednotkami jsou galaktóza a její 3,6-anhydro derivát, které jsou vzájemně propojeny $\alpha(1\rightarrow3)$ nebo $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glykosidickými vazbami. Existují tři základní skupiny karagenanů, které se liší ve stupni sulfatace a rozpustnosti ve vodě. Kappa-karagenan má jednu sulfátovou skupinu v dimeru a tvoří tvrdé gely ve vodném prostředí. Iota-karagenan obsahuje dva sulfáty a tvoří měkké gely, přičemž lambda-karagenan se třemi sulfáty nevykazuje gelující vlastnosti.

15

Kyselina hyaluronová je nesulfatovaný glykosaminoglykan, který je složený ze dvou opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a *N*-acetyl-D-glukosaminu.



20

kde

R^1 je H nebo Na .

Molekulová hmotnost nativní kyseliny hyaluronové se pohybuje v rozsahu $5 \cdot 10^4$ až $5 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Tento značně hydrofilní polysacharid tvoří součást pojivových tkání, kůže, synoviální tekutiny kloubů, hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je organizace proteoglykanů, hydratace a diferenciace buněk. Vzhledem k tomu, že se jedná o polymer tělu vlastní a tudíž biodegradovatelný, stává se vhodným substrátem pro tkáňové inženýrství, nebo jako nosič biologicky aktivních látek.

30

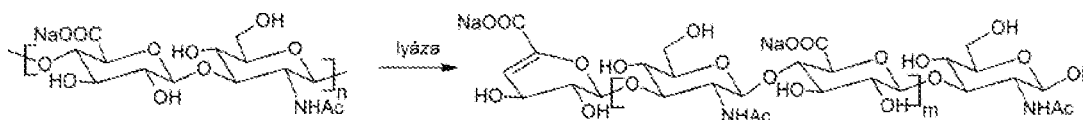
Polysacharidy obsahující násobné vazby

Polysacharidy s $-C=C-$ násobnou vazbou, která je součástí sacharidového cyklu, a přitom není umístěná na konci řetězce, jsou velmi vzácné. Z běžných polysacharidů jsou popsány například 5,6-nenasycené deriváty celulózy známe jako celulozény (Vigo T. L. a kol. *Polymers for Advanced Technologies*, 10, 6, 311–320, 1999), případně jejich 2,3-nenasycené analogy. Postup přípravy 5,6-nenasycených derivátů je založen na eliminační reakci odstupující skupiny v poloze 6 a vodíku v poloze 5 v bazickém prostředí, přičemž produktem je enol ether ($-C=C-$ násobná vazba v konjugaci s heterocyklickým kyslíkem). Příprava 2,3-nenasycených derivátů celulózy, amylózy nebo xylanu (D. Horton a kol. *Carbohydrate Research*, 40,2,345–352, 1975) vyžaduje kromě přítomnosti odstupujících skupin i redukční činidlo, nejčastěji zinek, přičemž produktem je standardní alken (bez konjugace násobné vazby s kyslíkem).

40

45 Využití polysacharidů obsahujících násobné vazby

- Aplikace jsou převážně zaměřeny na modifikaci $-C=C-$ násobné vazby, která není přímou součástí sacharidového cyklu. Tyto metody jsou postaveny na připojení nové substance na skelet polymeru, kde dochází k zásadní změně struktury čili ke ztrátě nativního charakteru polysacharidů. V takových případech se násobná vazba běžně používá v polymerizačních (Bellini D. WO96/37519), adičních (Khetan S. a kol. *Soft Matter*, 5, 1601–1606, 2009) nebo cykloadičních reakcích (Nimmo Ch. M. a kol. *Biomacromolecules*, 12, 824–830, 2011; Bobula, T. a kol. *Carbohydrate Polymers*, 125, 153–160, 2015). Tyto způsoby mohou vést jak k efektivnímu síťování polysacharidů (Collins M. N. a kol. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1262–1279, 2013; Hacker M. C. a kol., *Inter. J. of Mol. Sc.*, 16, 27677–706, 2015), tak k selektivnímu vázání aktivních substancí na polymer (Mero A. a kol. *Polymers*, 6, 346–369, 2014). Velmi populární je i možnost využít násobní vazby metakrylátové skupiny pro uskutečnění polymerizační reakce (Granstrom M. a kol. EP2899214).
- Existuje jenom několik způsobů, jak zavést násobnou $-C=C-$ 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 (viz schéma níže).



20

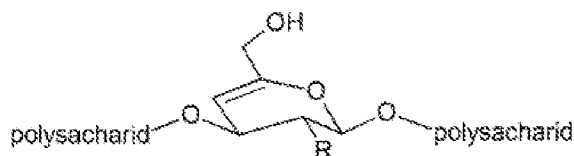
- To znamená, že zastoupení takové modifikace je silně závislé na molekulové hmotnosti, například při molekulové hmotnosti $4 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ je modifikován jeden disacharid ze sta, v případě molekulové hmotnosti $4 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ je modifikován jeden disacharid z tisíce. Je tedy zřejmé, že pokud se nejedná o oligomery polysacharidů, je tento typ modifikace pro vyšší molekulové hmotnosti polymerů nepatrný a výsledný vysokomolekulární polymer se prakticky neliší od výchozího.

- Druhý způsob umožňuje zavést dvojnou vazbu do struktury polysacharidu v poloze 4 a 5 po celé délce řetězce, takže lze efektivně modifikovat i polymery s vyšší molekulovou hmotností (Buffa R. a kol. WO2014/023272, Bobula T. a kol. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1002–1009, 2016). Tento způsob však vytváří $-C=C-$ násobnou vazbu, která je v přímé konjugaci se silně elektronakceptorní aldehydickou skupinou. Tato modifikace výrazně mění chemické vlastnosti polysacharidů, protože umožňuje kovalentní vázání poměrně široké škály nukleofilů, nejčastěji aminů. Z výše uvedeného také vyplývá, že takhle modifikovaný polymer má citelně vyšší elektrofilní charakter, tudíž se chemicky výrazně liší od nativního polymeru. Lze ho taky považovat za méně aktivní antioxidant v porovnání s nemodifikovaným polymerem.

- Tyto nedostatky odstraňuje řešení popsané v tomto vynálezu, kde modifikovaný polymer oproti nemodifikovanému neobsahuje žádnou reaktivní elektrofilní skupinu. Oproti tomu dvojnou vazbu v konjugaci s heterocyklickým kyslíkem lze považovat za seskupení s nukleofilními (antioxidačními) vlastnostmi.

45 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou deriváty polysacharidů obsahující ve své struktuře heterocyklus s dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 podle strukturního vzorce X,

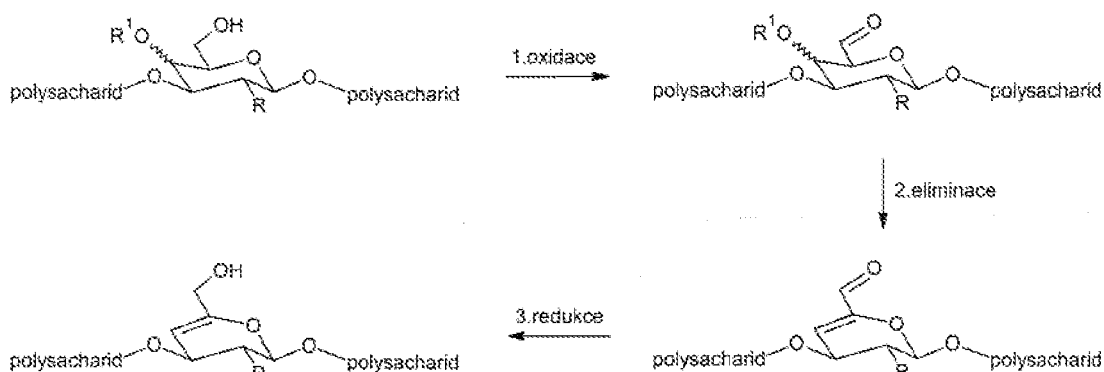


(X),

kde R je skupina $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ nebo $-\text{OH}$.

Deriváty mají molekulovou hmotnost v rozmezí $5 \cdot 10^3$ až $5 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a výchozí polysacharidy pro přípravu derivátů podle vynálezu jsou s výhodou vybrány ze skupiny obsahující chondroitin sulfát, karagenan, dermatan sulfát, kyselinu hyaluronovou nebo keratan sulfát.

Dále se vynález týká způsobu přípravy, který je založen na třech krocích (viz schéma níže):



kde R je skupina $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ nebo $-\text{OH}$, a R^1 je skupina $-\text{SO}_2-\text{ONa}$, $-\text{SO}_2-\text{OH}$ nebo $-\text{H}$

1. Oxidace – zavedení aldehydické skupiny do polohy 6 sacharidového cyklu.

Oxidace primární hydroxylové skupiny v poloze 6 na aldehyd. Reakci lze provést například použitím oxidačního systému 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyl radikálu TEMPO / NaClO ve vodě. Tento krok probíhá s výhodou ve vodě při teplotě 0 až 10°C , molární množství NaClO je v rozmezí 0,03 až 0,8 ekv. a molární množství TEMPO je v rozmezí 0,005 až 0,2 ekv. vzhledem k opakující se jednotce polysacharidů. Výchozí polysacharid může mít molekulovou hmotnost v rozsahu $5 \cdot 10^3$ až $5 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a použije se s výhodou 0,1 až 8 % hmotn. vodný roztok polysacharidů. Nakonec se do reakční směsi pro ukončení reakce za účelem likvidace zbytků nezreagovaného činidla (chlomanu) může přidat například etanol, thiosíran sodný aj. Alternativně lze oxidaci provést pomocí systému 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-onu (DMP) při teplotě 10 až 50°C v DMSO, kde množství DMP je v rozmezí 0,05 až 2 ekv. vzhledem k opakující se jednotce polysacharidů.

2. Eliminace –

2a. pokud $\text{R}^1 = -\text{H}$, dochází k eliminaci vody (dehydratace).

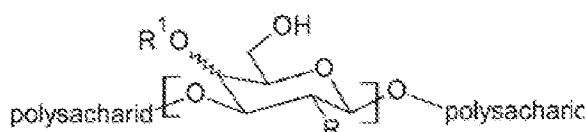
Je možné ji s výhodou uskutečnit ve vodně-organickém prostředí, kde organické rozpouštědlo je mísitelné s vodou a objemový poměr rozpouštědlo/voda je v rozsahu 3/1 až 1/2. S výhodou lze v tomto kroku použít báze například pyridin, triethylamin nebo *N,N*-diisopropylethylamin, nebo anorganické báze, např. $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Množství báze v reakci je 0,01 až 20 ekvivalentů, s výhodou 5 až 10 ekvivalentů přepočteno na opakující se jednotku polysacharidů. Jako organická

rozpouštědla je možné použít aprotická polární rozpouštědla mísitelná s vodou, s výhodou DMSO nebo sulfolan. Oxidace probíhá 0,1 až 12 hod, s výhodou 1 až 4 hod, druhý krok reakce probíhá 12 až 150 hodin, s výhodou 20 až 40 h, při teplotě 30 až 80 °C, s výhodou 50 až 60 °C.

- 5 2b. pokud $R^1 = -SO_2-ONa$, resp. $-SO_2-OH$, dochází k eliminaci $NaO-SO_2-Ona$, resp. $HO-SO_2-ONa$. Pokud je skupina $-OR^1$ v poloze 4 cyklu v antiperiplanární pozici k vodíku v poloze 5, probíhá eliminace spontánně bez nutnosti přidavku bází a bez nutnosti navýšení reakční teploty. Doba trvání reakce kroku 1 + 2b je 0,1 až 12 hod, s výhodou 1 až 4 hod. Pokud není skupina $-OR^1$ v poloze 4 sacharidového cyklu v antiperiplanární pozici k vodíku v poloze 5, k efektivní eliminaci lze použít i postup popsany v části 2a.

3. Redukce – aldehydická skupina je selektivně redukována s borohydridy, s výhodou s $NaBH_4$ za vzniku primárního alkoholu $-CH_2-OH$ se zachováním násobné vazby v poloze 4 a 5 sacharidového cyklu. Ačkoli by odborník očekával kromě redukce aldehydické skupiny $-CHO$ (resp. geminálního diolu $-CH(OH)_2$) i redukci $-C=C-$ vazby, překvapivě k redukci dvojné vazby $-C=C-$ při způsobu podle vynálezu nedochází. Množství redukčního činidla může být v rozsahu 0,1 až 10 ekvivalentů přepočteno na opakující se jednotku polysacharidů, s výhodou 0,3 až 2 ekvivalentů. Reakci lze provést ve vodě při teplotě 5 až 40 °C při pH 5 až 10, s výhodou při teplotě 15 až 25 °C a pH 6 až 8 v čase 1 až 24 h. Východí roztok aldehydu polysacharidu má s výhodou koncentraci 0,1 až 8 % hmotn.

Z uvedeného vyplývá, že pro přípravu derivátů polysacharidů podle způsobu chráněného tímto vynálezem je nezbytné, aby vstupní polysacharid obsahoval strukturu Y,



(Y)

- která zahrnuje (1→3) propojený sacharidový cyklus, dále primární $-CH_2-OH$ skupinu v poloze 6 a $-OH$, $-SO_2-OH$ nebo $-SO_2-ONa$ skupinu v poloze 4. Skupina v poloze 2 není klíčová pro úspěšný průběh dané modifikace, pro většinu polysacharidů je $R = -OH$ nebo $-NH-CO-CH_3$.

- Dále se vynález týká způsobu použití derivátů polysacharidů obecného vzorce X. Jak už bylo zmíněno výše, řešení popsané v tomto vynálezu nabízí nové typy derivátů polysacharidů se zvýšenou nukleofilitou (antioxidačními vlastnostmi), přitom jenom s nepatrnou změnou primární struktury polysacharidu způsobenou eliminací vodíku z polohy 5 a skupiny $-OH$, $-O-SO_2-OH$ nebo $-O-SO_2-ONa$ z polohy 4. Antioxidační schopnosti těchto nových derivátů byly prokázány standardním stanovením s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikálem, kde byl zjištěn významný rozdíl mezi nenasycenými deriváty polysacharidů připravenými podle vynálezu a nasycenými (nemodifikovanými) analogy. Proto lze deriváty podle vynálezu použít například pro přípravu materiálů s antioxidačním účinkem.

- Dále bylo zjištěno, že pokud je polysacharidem kyselina hyaluronová, lze nenasycený derivát použít pro přípravu materiálů s antirakovinovým účinkem. Biologické vlastnosti připravených derivátů byly testovány na několika liniích rakovinových buněk, kde byla ve všech případech pozorována snížená viabilita, přičemž růst standardních fibroblastů nebyl potlačen v celém rozsahu testovaných koncentrací.

- Termín "polysacharid" znamená polysacharid obsahující strukturní jednotku Y, jako například kyselinu hyaluronovou, karagenan, dermatan sulfát, keratan sulfát nebo chondroitin sulfát nebo jejich farmaceuticky přijatelnou sůl.

Termín "farmaceuticky přijatelná sůl" znamená soli, jež jsou bezpečné a účinné pro *in vivo* použití a mají požadovanou biologickou aktivitu. Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují s výhodou ionty alkalických kovů nebo iontů kovů alkalických zemin, výhodněji Na⁺, K⁺, Mg⁺ nebo Li⁺.

5

Realizace řešení popsaného v tomto vynálezu není technologicky komplikovaná a nevyžaduje použití drahých chemikálií, rozpouštědel nebo izolačních postupů.

10 Objasnění výkresů

Obr. 1 – vliv ΔHA připraveného podle Příkladu 25 na viabilitu buněk

15

Graf zobrazuje průběh inhibice růstu karcinogenních buněk MDA-MB-231 – prsní adenokarcinom, A-549 – plicní adenokarcinom, HEP-G2 – hepatocelulární karcinom v porovnání s inhibicí NHDF – primárních lidských kožních fibroblastů

Postup je popsán v příkladu 27.

20

Obr. 2 – antioxidační vlastnosti materiálů ΔHA a ΔCS v porovnání s nemodifikovanými polysacharidy HA, CS a standardem Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

25

HA – kyselina hyaluronová

ΔHA – kyselina hyaluronová dehydratovaná v poloze 4 a 5 (Příklad 22)

CS – chondroitin sulfát

30

ΔCS – chondroitin sulfát dehydratovaný v poloze 4 a 5 (Příklad 2)

testováno pomocí 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DTTH) postupem popsaným v příkladu 23

35

T-test statistické významnosti – * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Příklady uskutečnění vynalezu

40

DS = stupeň substituce = 100 % * (molární množství modifikované jednotky polysacharidů) / (molární množství opakujících se jednotek polysacharidů)

45

Zde používaný výraz ekvivalent (ekv) se vztahuje na opakující se jednotku příslušného polysacharidů, není-li uvedeno jinak. Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak.

Molekulová hmotnost výchozích polysacharidů je hmotnostně střední stanovená pomocí metody SEC-MALLS.

50

Příklad 1

Oxidace a eliminace chondroitin sulfátu (CS) = Příprava α,β-nenasyceného aldehydu CS

55

Do dvouprocentního vodného roztoku CS (200 mg, Mw = 4.10⁴ g.mol⁻¹) vychlazeného na 5 °C s obsahem hydrogenfosfátu sodného dodekahydrátu (2,2 ekv), bromidu sodného (0,8 ekv) a 4-AcNH-TEMPO (0,01 ekv.) se postupně přidával vodný roztok chlomanu sodného (0,8 ekv, 11%

aktivního chloru). Směs se míchala 2 h při teplotě 5 °C. Následně byl k reakci přidán etanol (10 ekv) a reakce byla míchána další hodinu při laboratorní teplotě. Produkt byl izolován srážením s IPA a analyzován pomocí NMR.

5 DS = 23 % (stanoveno z NMR)

Příklad 2

Redukce α,β -nenasyceného aldehydu CS = Příprava Δ CS

10

Byl připraven 2% w/v roztok α,β -nenasyceného aldehydu CS (200 mg, 0,5 mmol) v destilované vodě, roztok byl vychlazen na 5 °C a následně byly k němu přidány 2 ekvivalenty borohydridu sodného. Reakční směs byla míchána 4 h při 5 °C. Produkt byl izolován srážením s izopropanolem a analyzován pomocí NMR,

15

DS = 25 % (stanoveno z NMR), $M_w = 2 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (stanoveno SEC/MALLS)

Spektrální analýza Δ CS: NMR ^1H (500 MHz, D_2O , δ ppm): 2,02 a 2,04 (3H; Ac-NH-, bs); 4,03 (2H; H6; bs); 4,22 (1H; H2; bs); 4,26 (1H; H3; bs); 5,06 (1H; H1; bs); 5,18 (1H; H4; bs); NMR

20

^1H - ^1H COSY (D_2O); krosníky; δ ppm: 4,22–5,06; 4,26–5,18; NMR ^1H - ^{13}C HSQC (D_2O); krosníky; δ ppm: 4,03–61,0; 4,22–50,5; 4,26–73,4; 5,06–98,3; 5,18–98,9; NMR DOSY (D_2O); log D ((2,02 and 2,04; Ac-NH-); (4,03; H6); (4,22; H2); (4,26; H3); (5,06; H4); (5,18; H1)) ~ -10,4 m^2s^{-1} ; log D (4,72; H_2O) ~ -8,6 m^2s^{-1} ; IR (KBr; cm^{-1}): 1660 (v -C=C- st);

25

Příklad 3

Oxidace a eliminace dermatan sulfátu (DeS) = Příprava α,β -nenasyceného aldehydu DeS

30

Do dvouprocentního vodného roztoku DeS (200 mg, 0,42 mmol) vychlazeného na 5 °C s obsahem hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu (2,2 ekv), bromidu sodného (0,8 ekv) a 4-AcNH-TEMPO (0,01 ekv) se postupně přidával vodný roztok chlomanu sodného (0,8 ekv, 11% aktivního chloru), směs se míchala 2 h při teplotě 5 °C. Následně byl k reakci přidán etanol (10 ekv) a reakce byla míchána další hodinu při laboratorní teplotě. Produkt byl izolován srážením s IPA a analyzován pomocí NMR.

35

DS = 20 % (stanoveno z NMR)

Příklad 4

40

Redukce α,β -nenasyceného aldehydu dermatan sulfátu = Příprava Δ DeS

Byl připraven 2% w/v roztok α,β -nenasyceného aldehydu DeS (200 mg, 0,5 mmol) v destilované vodě. Roztok byl vychlazen na 5 °C a následně byl k němu přidán borohydrid sodný (2 ekvivalenty na disacharid DeS). Reakční směs byla míchána 4 h při 5 °C. Produkt byl izolován srážením s izopropanolem a analyzován pomocí NMR.

45

DS = 23 % (stanoveno z NMR)

50

Spektrální analýza Δ DeS: NMR ^1H (500 MHz, D_2O , δ ppm): 2,01 (3H, Ac-NH-, bs), 5,05 (1H, H1, bs), 5,17 (1H, H1, bs).

Příklad 5

Oxidace a eliminace karagenanu (KA) = Příprava α,β -nenasyceného aldehydu KA

- 5 Do jednoprocenního vodného roztoku KA (200 mg, 0,31 mmol) vychlazeného na 10 °C s obsahem hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu (2,2 ekv), bromidu sodného (0,8 ekv) a 4-AcNH-TEMPO (0,01 ekv) se postupně přidával vodný roztok chlornanu sodného (0,8 ekv, 11% aktivního chloru). Směs se míchala 2 h při teplotě 10 °C. Následně byl k reakci přidán etanol (10 ekv) a reakce byla míchána další hodinu při laboratorní teplotě. Produkt byl izolován
10 srážením s IPA a analyzován pomocí NMR.

DS = 10 % (stanoveno z NMR)

Příklad 6

15

Redukce α,β -nenasyceného aldehydu karagenanu = Příprava Δ KA

- Byl připraven 2% w/v roztok α,β -nenasyceného aldehydu KA (200 mg, 0,5 mmol) v destilované vodě. Roztok byl vychlazen na 5 °C a následně byl k němu přidán borohydrid sodný (2
20 ekvivalenty na disacharid KA). Reakční směs byla míchána 4 h při 5 °C. Produkt byl izolován srážením s izopropanolem a analyzován pomocí NMR.

DS = 13 % (stanoveno z NMR)

- 25 NMR ^1H (500 MHz, D_2O , δ ppm): 5,07 (1H, H1, bs), 5,18 (1H, H1, bs),

Příklad 7

Oxidace keratan sulfátu (KS) = Příprava KS-aldehydu

30

- Do jednoprocenního vodného roztoku KS (1 g, $2 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) s obsahem NaCl 1%, KBr 1%), TEMPO (0,01 ekv) a NaHCO_3 (20 ekv), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,3 ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 24 h při teplotě 0 °C, pak se přidal 0,1 g tiosulfátu sodného a směs
35 byla míchaná ještě 10 minut. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO_3) třikrát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě sedmkrát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

DS 3 % (stanoveno z NMR)

40 Příklad 8

Eliminace KS-aldehydu = Příprava α,β -nenasyceného aldehydu KS

- Do tříprocenního roztoku KS-aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=3 %, příklad 7) ve vodě se
45 přidalo 6,7 ml DMSO a báze DIPEA (5 ekv). Směs se míchala 72 h při teplotě 60 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 2 % (stanoveno z NMR),

- 50 ^1H NMR (D_2O) δ 9,22 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{O}$), 6,32 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{O}$)

Příklad 9

Redukce α,β -nenasyceného aldehydu KS = Příprava Δ KS

55

Do 2% roztoku α,β -nenasyceného aldehydu KS (200 mg, Příklad 8) v destilované vodě, byl přidán borohydrid sodný (2 ekv) při 5 °C. Reakční směs byla míchána 3 h při 5 °C pak srážena s izopropanolem a analyzována pomocí NMR.

5 DS = 2 % (stanoveno z NMR)

^1H NMR (D_2O) 5,05 (1H, H1, bs), 5,17 (1H, H4, bs)

Příklad 10

10

Oxidace kyseliny hyaluronové (HA) = Příprava HA–aldehydu

Do jednocentního vodného roztoku HA (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), s obsahem NaCl 1%, KBr 1%), TEMPO (0,01 ekv.) a NaHCO_3 (20 ekv), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,5 ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 12 h při teplotě 0 °C, pak se přidal 0,5 ml etanolu a směs byla míchaná ještě 1 hodinu. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1 % NaCl, 0,1% NaHCO_3) třikrát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě sedmkrát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

20 DS 10 % (stanoveno z NMR)

Příklad 11

Oxidace HA = Příprava HA–aldehydu

25

Do jednocentního vodného roztoku HA (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), s obsahem NaCl 1%, KBr 1%), N-acetylamo–TEMPO (0,01 ekv) a NaHCO_3 (20 ekv), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0, ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 12 h při teplotě 10 °C, pak se přidal 0,1 ml etanolu a směs byla míchaná ještě 1 hodinu. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO_3) třikrát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě sedmkrát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

DS 9 % (stanoveno z NMR)

35 Příklad 12

Oxidace HA = Příprava HA–aldehydu

Do jednocentního vodného roztoku HA (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), s obsahem NaCl 1%, KBr 1%), TEMPO (0,2 ekv) a NaHCO_3 (10 ekv), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,3 ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 48 h při teplotě 5 °C, pak se přidal 0,1 ml etanolu a směs byla míchaná ještě 1 hodinu. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1 % NaHCO_3) třikrát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě sedmkrát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

45

DS 5 % (stanoveno z NMR)

Příklad 13

50 Oxidace kyseliny hyaluronové (HA) = Příprava HA–aldehydu

Do jednocentního vodného roztoku hyaluronanu (1 g, $2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), s obsahem NaCl 1%, KBr 1%), TEMPO (0,01 ekv) a NaHCO_3 (20 ekv), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,7 ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 0,5 h při teplotě 0 °C, pak se přidal 0,1 ml etanolu a směs byla míchaná ještě 1 hodinu. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a

55

dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO₃) třikrát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě sedmkrát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

DS 9 % (stanoveno z NMR)

5

Příklad 14

Oxidace kyseliny hyaluronová (HA) = Příprava HA–aldehydu

- 10 Do jednoprocenního vodného roztoku HA (1 g, $2 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹), s obsahem NaCl 1%, KBr 1%), TEMPO (0,01 ekv) a NaHCO₃ (20 ekv), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,5 ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 12 h při teplotě 0 °C, pak se přidal 0,1 ml etanolu a směs byla míchaná ještě 1 hodinu. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO₃) třikrát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě sedmkrát
- 15 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

DS 10 % (stanoveno z NMR)

Příklad 15

20

Oxidace kyseliny hyaluronová (HA) = Příprava HA–aldehydu

- Do jednoprocenního roztoku kyselé formy hyaluronanu (1 g, $1 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹), v bezvodém DMSO, se přidal 1,2 ekvivalentu 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-onu (Dess–Martin Periodinan) a směs se míchala 5 h při teplotě 20 °C. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1 % NaCl, 0,1% NaHCO₃) třikrát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě sedmkrát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.
- 25

- 30 DS 40 % (stanoveno z NMR)

Příklad 16

Eliminace HA–aldehydu = Příprava α,β -nenasyceného aldehydu HA

35

Do tříprocenního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=40 %, příklad 15) ve vodě se přidalo 6,7 ml DMSO a báze DIPEA (5 ekv). Směs se míchala 72 h při teplotě 60 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

- 40 DS 20 % (stanoveno z NMR),

¹H NMR (D₂O) δ 9,24 (s, 1H, –CH=O, 6,32 (m, 1H, –CH=C–CH=O)

UV–Vis (D₂O) 252 nm, π – π^* přechod α,β -nenasycený aldehyd

45

Příklad 17

Eliminace HA–aldehydu = Příprava α,β -nenasyceného aldehydu HA

- 50 Do tříprocenního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10%, příklad 10) ve vodě se přidalo 6,7 ml DMSO a báze triethylaminu (20 ekv). Směs se míchala 150 h při teplotě 30 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 5 % (stanoveno z NMR)

55

Příklad 18

Eliminace HA–aldehydu = Příprava α,β –nenasyceného aldehydu HA

- 5 Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 10) ve vodě se přidalo 6,7 ml DMSO a báze pyridinu (0,01 ekv). Směs se míchala 12 h při teplotě 80 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 3 % (stanoveno z NMR),

10

Příklad 19

Eliminace HA–aldehydu = Příprava α,β –nenasyceného aldehydu HA

- 15 Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 10) ve vodě se přidalo 1,7 ml DMSO a báze pyridin (10 ekv). Směs se míchala 48 h při teplotě 60 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 4 % (stanoveno z NMR),

20

Příklad 20

Eliminace HA–aldehydu = Příprava α,β –nenasyceného aldehydu HA

- 25 Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 10) ve vodě se přidalo 10 ml DMSO a báze DIPEA (5 ekv). Směs se míchala 48 h při teplotě 60 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 5 % (stanoveno z NMR),

30

Příklad 21

Eliminace HA–aldehydu = Příprava α,β –nenasyceného aldehydu HA

- 35 Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 10) ve vodě se přidalo 6,7 ml sulfolanu a báze DIPEA (5 ekv). Směs se míchala 72 h při teplotě 50 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 5 % (stanoveno z NMR),

40

Příklad 22

Redukce α,β –nenasyceného aldehydu HA = Příprava Δ HA

- 45 Do 2% roztoku α,β –nenasyceného aldehydu HA (200 mg, Příklad 16) v destilované vodě, byl přidán borohydrid sodný (10 ekv) při 5 °C. Reakční směs byla míchána 1 h při 5 °C, pak srážena s izopropanolem a analyzována pomocí NMR.

DS = 20 % (stanoveno z NMR)

50

^1H NMR (D_2O) 5,06 (1H, H1, bs), 5,17 (1H, H1, bs)

Příklad 23

Redukce α,β -nenasyceného aldehydu HA = Příprava Δ HA

- 5 Do 2% roztoku α,β -nenasyceného aldehydu HA (200 mg, Příklad 17) v destilované vodě, byl přidán borohydrid sodný (0,1 ekv) při 5 °C. Reakční směs byla míchána 20 h při 5 °C, pak srážena s izopropanolem a analyzována pomocí NMR,

DS = 4 % (stanoveno z NMR)

10

Příklad 24

Redukce α,β -nenasyceného aldehydu HA = Příprava Δ HA

- 15 Do 2% roztoku α,β -nenasyceného aldehydu HA (200 mg, Příklad 17) v destilované vodě, byl přidán borohydrid sodný (1 ekv) při 40 °C. Reakční směs byla míchána 1 h při 40 °C, pak srážena s izopropanolem a analyzována pomocí NMR,

DS = 5 % (stanoveno z NMR)

20

Příklad 25

Redukce α,β -nenasyceného aldehydu HA = Příprava Δ HA

- 25 Do 2% roztoku α,β -nenasyceného aldehydu HA (200 mg, Příklad 17) v destilované vodě, byl přidán borohydrid sodný (2 ekv) při 20 °C. Reakční směs byla míchána 4 h při 20 °C, pak srážena s izopropanolem a analyzována pomocí NMR,

DS = 5 % (stanoveno z NMR)

30

Příklad 26

Stanovení antioxidační aktivity (obrázek 2).

- 35 Antioxidační aktivita polysacharidů Δ HA připraveného podle příkladu 22 a Δ CS připraveného podle příkladu 2, byla stanovena pomocí stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH). Toto stanovení bylo uskutečněno podle literatury (Brand-Williams W. a kol, *LWT – Food Science and Technology*, 28, 1, 25–30, 1995) s malou modifikací. Stručně, 100 μ l 0,01% roztoku DPPH v metanolu bylo přidáno do 100 μ l testované substance rozpuštěné v 50 mM Tris pH 7,1. Pokles absorbance byl měřen po 15 min při 515 nm. Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) byl použit jako pozitivní kontrola. Data byla měřena třemi nezávislými experimenty. Pro analýzu statistické významnosti byla data vyhodnocena T-testem * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (obrázek 2).

45

Příklad 27

Testování cytotoxicity derivátů připravených podle příkladu 25 (obrázek 1)

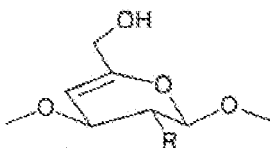
- 50 Bylo porovnáváno cytotoxické působení derivátu HA na nenádorových buňkách – primárních lidských kožních fibroblastech (NHDF) a dále na nádorových liniích prsního karcinomu (MDA-MB-231), plicního karcinomu (A-549) a hepatocelulárního karcinomu (HEP-G2). Pro experimenty byly buňky kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5% CO₂) v příslušném médiu (10% FBS – fetální bovinní sérum). Při dosažení 80% konfluency byly buňky zpasážované, spočítané pomocí automatického počítadla CASY TT, Roche a nasazené na 96-jamkové panely v hustotě 5000 buněk na jamku v 200 μ l média. Po 24 hodinách bylo médium

55

vyměněno za roztoky testovaných látek v koncentracích 1000, 500, 100 a 10 µg/ml 10% média. V čase 24, 48 a 72 hodin po ovlivnění byla měřena viabilita buněk pomocí MTT testu – do každé jamky bylo přidáno 20 µl roztoku MTT (5 mg/ml), následovala 2,5 hodinová inkubace, po které byly buňky lyžovány solubilizačním roztokem (IPA:DMSO 1:1 s 10% Triton X-100 a 9,9% 37% HCl) po dobu 30 minut. Následně se měřila absorbance na přístroji Microplate reader VERSAmax při vlnové délce 570 nm a 690 nm (korekce pozadí). Viabilita ovlivněných buněk byla při vyhodnocení vztažena k neovlivněné kontrole, která na obrázku 1 odpovídá nulové hodnotě. Hodnoty vyšší, než nula značí aktivaci buněk (žádný cytotoxický efekt derivátů) a naopak hodnoty nižší, než nula ukazují na sníženou viabilitu buněk – tedy cytotoxický efekt derivátů. V případě NHDF je z obrázku č. 1 zřejmé, že testovaný derivát nepůsobil cytotoxický. V případě nádorových linií (MDA-MB-231, A-549, HEP-G2) byl zaznamenán cytotoxický efekt derivátů. Na základě výsledků uvedených testů lze vyvodit potenciální protinádorový účinek derivátu (Obrázek 1).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nenasyčené deriváty polysacharidů obsahující ve struktuře minimálně jeden heterocyklus s dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 podle strukturního vzorce X,

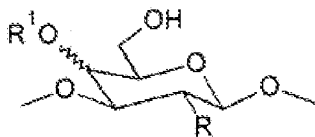


(X),

kde R je skupina --NH--CO--CH_3 nebo --OH a kde polysacharidy jsou vybrány ze skupiny sestávající z chondroitin sulfátu, karagenanu, dermatan sulfátu, kyseliny hyaluronové nebo keratan sulfátu.

2. Deriváty polysacharidů podle nároku 1, kde molekulová hmotnost derivátů je v rozmezí $5 \cdot 10^3$ až $5 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

3. Způsob přípravy derivátů polysacharidů definovaných v nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se výchozí polysacharid obsahující fragment Y



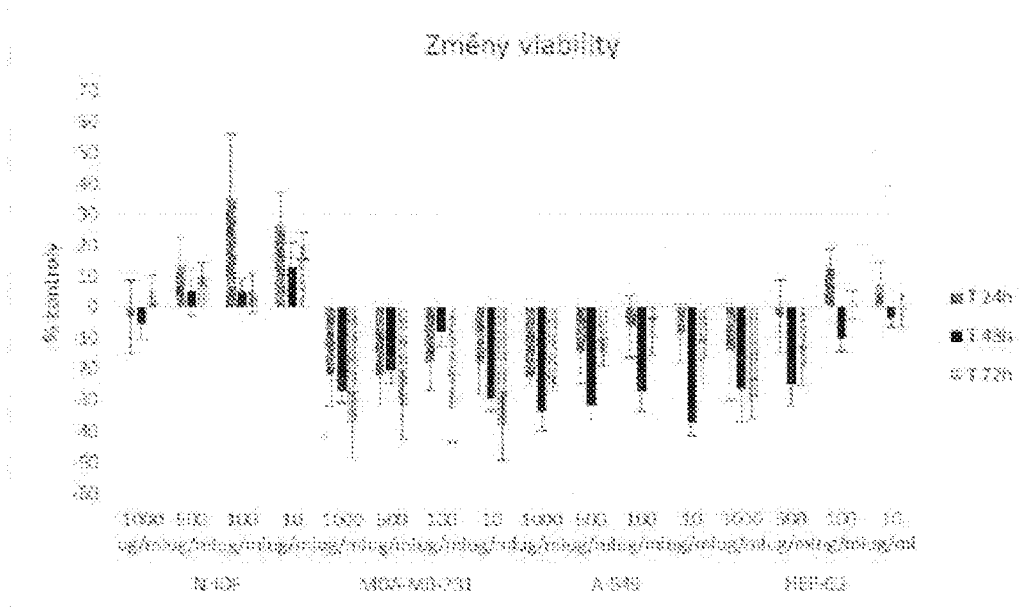
(Y)

kde R je skupina --NH--CO--CH_3 nebo --OH , a R^1 je skupina $\text{--SO}_2\text{--ONa}$, $\text{--SO}_2\text{--OH}$ nebo --H , v prvním kroku oxiduje na aldehyd v poloze 6, v druhém kroku se eliminuje v polohách 4 a 5 cyklu za vzniku dvojné vazby a ve třetím kroku se selektivně redukuje aldehydická skupina --CHO v poloze 6 na skupinu $\text{--CH}_2\text{OH}$ při současném zachování dvojné vazby v polohách 4 a 5 cyklu.

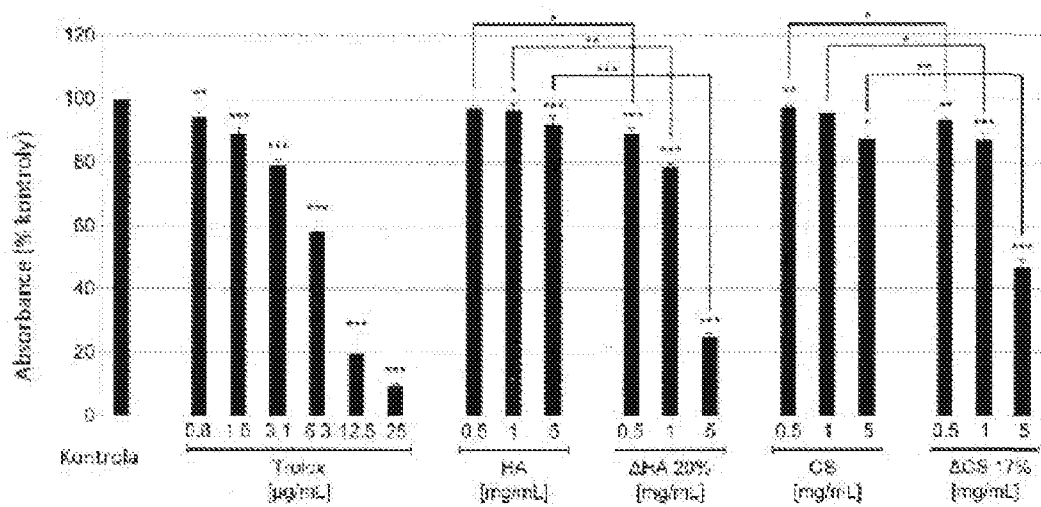
4. Způsob přípravy podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že výchozím polysacharidem je chondroitin sulfát, karagenan, dermatan sulfát, kyselina hyaluronová nebo keratan sulfát.

5. Způsob přípravy podle nároku 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že oxidace v pozici C-6 v prvním kroku probíhá buď pomocí systému 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyl radikálu neboli TEMPO-radikálu, nebo R^3 -TEMPO/NaClO, kde R^3 je vodík nebo skupina N-acetyl, ve vodě při teplotě 0 až 10 °C, kde molární množství NaClO je v rozmezí 0,3 až 0,8 ekv. a molární množství R^3 -TEMPO je v rozmezí 0,005 až 0,2 ekv. vzhledem k opakující se jednotce polysacharidu, nebo pomocí 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-onu (DMP) při teplotě 10 až 50 °C v DMSO, kde množství DMP je v rozmezí 0,05 až 2 ekv. vzhledem k opakující se jednotce polysacharidu.
6. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 3 až 5, **vyznačující se tím**, že výchozím polysacharidem je kyselina hyaluronová nebo keratan sulfát a že oxidovaný polysacharid ve druhém kroku podléhá eliminační reakci ve směsi voda/polární aprotické rozpouštědlo v přítomnosti báze při teplotě 30 až 80 °C, s výhodou při teplotě 50 až 60 °C.
7. Způsob přípravy podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že množství báze je 0,01 až 20 ekvivalentů, s výhodou 5 až 10 ekvivalentů vzhledem k opakující se jednotce polysacharidu, přičemž báze je vybrána ze skupiny zahrnující organické báze, s výhodou pyridin, triethylamin nebo N-diisopropylethylamin, nebo anorganické báze, s výhodou $Ca(OH)_2$.
8. Způsob přípravy podle nároku 6 nebo 7, **vyznačující se tím**, že aprotické rozpouštědlo je mísitelné s vodou a zahrnuje s výhodou DMSO nebo sulfolan, a objemový poměr rozpouštědlo/voda je v rozsahu 3/1 až 1/2.
9. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 6 až 8, **vyznačující se tím**, že druhý krok reakce probíhá po dobu 12 až 150 hodin.
10. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 3 až 5, **vyznačující se tím**, že výchozím polysacharidem je chondroitin sulfát, karagenan nebo dermatan sulfát a že se oxidovaný polysacharid ve druhém kroku spontánně eliminuje přímo v reakční směsi za vzniku α,β -nenasyceného aldehydu a spontánní eliminace probíhá při stejných podmínkách, při kterých proběhl první krok oxidace.
11. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 3 až 10, **vyznačující se tím**, že výchozí polysacharid má molekulovou hmotnost v rozsahu $5 \cdot 10^3$ až $5 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹.
12. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 3 až 11, **vyznačující se tím**, že ve třetím kroku se přidá borohydrid sodný v množství 0,1 až 10 ekvivalentů, s výhodou 0,3 až 2 ekvivalentů přepočteno na opakující se jednotku polysacharidu, ve vodě při teplotě 5 až 40 °C, s výhodou při teplotě 15 až 25 °C, při pH v rozmezí 5 až 10, s výhodou 6 až 8.
13. Použití derivátů definovaných v nároku 1 nebo 2 pro přípravu prostředku se zvýšeným antioxidačním účinkem.
14. Použití derivátů definovaných v nároku 2, kde polysacharidem je kyselina hyaluronová, pro přípravu prostředku s antirakovinovým účinkem.

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2