

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 974060 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **974060**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07H 11/00
C08B 37/00
A61K 31/7024
A61K 31/737**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.04.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **27.10.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.10.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **24.04.1996 PCT/AU1996/000238**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

28.04.1995 AU 2618

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •The Australian National University, Acton, ACT 2601 Australia, TOWN UNKNOWN, AUSTRALIA, (AU)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Parish, Christopher Rickhard, TOWN UNKNOWN, AUSTRALIA, (AU)

2 •Cowden, William Butler, TOWN UNKNOWN, AUSTRALIA, (AU)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Sulfatoitujen oligosakkaridien valmistus ja käyttö

Framställning och användning av sulfatiserade oligosakkarider

Sulfatoitujen oligosakkaridien valmistus ja käyttö – Framställning och användning av sulfatiserade oligosakkarider

5 Tämä keksintö koskee sulfatoituja oligosakkarideja, niiden valmistusta ja käyttöä antiangiogeenisina, antimetastaattisina ja/tai anti-inflammatorisina aineina.

10 Heparaanisulfaatit kuuluvat polysakkaridien glykosaminoglykaaniperheeseen. Niitä on läsnä useimmissa monisoluisissa eläimissä ja ne ovat jakautuneina kaikkialle ilmentyen useimpien kudosten solujen pinnalla ja soluväliaineessa (ECM, extracellular matrice) (1, 2). Hepariniisulfaatit esiintyvät tavallisesti proteoglykaaneina, ja molekyylin ydinpolypeptidien sekvensoinnissa ja kloonauksessa on edistytty huomattavasti. Tähän mennessä on esimerkiksi ainakin kahdeksan eri heparaanisulfaattiproteoglykaanin (HSPG) ydinpolypeptidiä tunnistettu solun pinnalta (3).

15 Alunperin HSPG:illä katsottiin olevan paljon rakenteellinen tehtävä solun pinnalla ja soluväliaineessa. Heparaanisulfaattiketjut ovat kuitenkin rakenteeltaan huomattavan erilaisia (2, 4), mikä johtaa ajattelemaan, että ne saattavat viestittää tietoa monia biologisia prosesseja varten. Niinpä vaikka heparaanisulfaattiketjut syntetisoituvat alunperin glukuronosyyli- ja N-asetyyli-glukosaminyylitähteiden yksinkertaisena vuorottelevana toistojaksona, joita yhdistävät β 1-4 ja α 1-4 -sidokset, niistä on olemassa monia myöhempiä muunnoksia. Polysakkaridi N-deasetyloituu ja N-sulfatoituu ja sen jälkeen läpikäy glukuronosyyliyksikköjen C5-epimerisaation iduronosyyliyksiköiksi ja erilaisia uronosyyli- ja glukosaminyylitähteiden O-sulfatoitumisia. Näiden muutosten vaihtelevuus tekee mahdolliseksi noin kolmekymmentä erilaista disakkaridisekvenssiä, joiden tuloksena, kun ne järjestetään eri järjestyksiin pitkin hepariniisulfaattiketjua, voi teoreettisesti olla valtava määrä erilaisia hepariniisulfaattirakenteita. Tässä mielessä antikoaguloiva polysakkaridihepariini, jota on ainoastaan syöttösolujyväsissä, edustaa hepariniisulfaatin äärimmäistä muotoa, jossa epimerisaatio ja sulfatoituminen ovat maksimaalisia. Useimmat hepariniisulfaatit sisältävät lyhyitä pätkiä erittäin sulfatoituneita tähteitä, joita liittävätkin toisiinsa sulfatoitumattomien yksikköjen suhteellisen pitkät jaksot.

20

25

30

Nyt on olemassa selvää näyttöä siitä, että hepariniisulfaateilla on ratkaiseva merkitys kovin monissa biologisissa prosesseissa (2-4). Erityisesti ne voivat toimia ligandeina

molekyylien adheesiossa, jota tapahtuu solujen välisissä vuorovaikutuksissa (5, 6), osallistua solun ja soluväliaineen interaktioihin (5, 6) ja toimia välttämättöminä solun pintareseptoreina kasvutekijöille, kuten emäksiselle fibroblastikasvutekijälle (bFGF) (7, 8) ja verisuonten endoteelikasvutekijälle (VEGF) (9). HSPG:t ovat myös
 5 eräs avainkomponentti tyvikalvoissa, jotka edustavat tärkeintä estettä solujen migraatiolle (10). Tyvikalvoesteet voivat rikkoutua vain silloin, kun solut tuottavat erilaisia hajottavia entsyymejä (11), joihin kuuluu eräs endoglykosidaasi, jota nimitetään heparanaasiksi, joka pilkkoo hepariinisulfaattiketjuja (12, 13).

On osoitettu, että monet biologiset prosessit, joihin heparaanisulfaatit osallistuvat,
 10 edellyttävät ainutlaatuisten heparaanisulfaattirakenteiden tunnistamista, sulfaattien aseman polysakkaridiketjussa ollessa ratkaisevan tärkeä (3). On esimerkiksi osoitettu, että määriteltyjä heparaanisulfaattisekvenssejä tunnistavat happamat ja emäksiset FGF:t (14-16) ja pilkkovat heparanaasit. Näiden havaintojen perusteella esillä olevan keksinnön tarkoituksena on ollut syntetisoida sulfatoituja oligosakkarideja, jotka
 15 estävät kasvutekijöitä tunnistamasta heparaanisulfaattia ja estävät heparanaaseja pilkkomasta heparaanisulfaatteja. Kasvutekijöiden estämisessä katsottiin pienimolekyyliainoisten heparaanisulfaatin matkijoiden olevan erityisen tehokkaita, koska nyt uskotaan, että solun pinnan heparaanisulfaatit välittävät niiden reseptoreihin sitoutuneita kasvutekijöitä verkkoutumista (17). Lisäksi sulfatoituneet oligosakkaridit
 20 olisivat tehokkaita heparanaasin estäjiä toimimalla tämän entsyymin pilkkoutumattomina substraatteina.

Sulfatoituja oligosakkarideja, joilla on kasvutekijöitä estävä vaikutus, voidaan käyttää muutamiin kliinisiin tarkoituksiin. Hepariini/heparaanisulfaattiin sitoutuvat kasvutekijät, kuten bFGF ja VEGF, ovat voimakkaita angiogeneesin käynnistäjiä (18).
 25 Aikuisissa angiogeneesiä esiintyy suhteellisen harvoin haavojen paranemisaikaa lukuunottamatta. Aikuisilla esiintyy kuitenkin joukko "angiogeneesistä riippuvia tautteja", joissa angiogeneesillä on ratkaiseva merkitys (18-20). Tärkein niistä on kiinteiden kasvainten kasvuun, proliferatiivisiin retinopatioihin ja nivelreumaan liittyvä angiogeneesi. Sulfatoituneet oligosakkaridit, jotka estäisivät tärkeimpien angiogeenisten kasvutekijöiden, kuten bFGF:n ja VEGF:n, vaikutuksen, olisivat
 30 erityisen hyödyllisiä näiden verisuonien uudiskasvusta riippuvaisten tautien hoidossa.

Heparanaasin vaikutusta estävillä sulfatoituilla oligosakkarideilla on myös joitakin kliinisiä sovelluksia. Endoteelinalainen tyvikalvo on tärkeä fyysinen este endoteelisolujen, kasvainsolujen ja leukosyyttien kulkemiselle verisuonten seinämän läpi.
 35 Heparanaasientsyymillä yhdessä erilaisten proteolyyttisten entsyymien (esimerkiksi

plasmiinin, väliainetta pilkkovien metalloproteinaasien) kanssa on olennainen merkitys sisääntulevien solujen vaikutuksesta tapahtuvassa tyvikalvon hajoamisessa (11-13, 21). Estäessään tyvikalvon hajoamista sulfatoituneilla oligosakkarideilla heparanaasia estävine vaikutuksineen olisi siis metastaaseja estävä ja

5 tulehduksenvastainen vaikutus ja lisäksi ne saattaisivat estää angiogeneesin varhaisvaiheita. Sulfatoitujen oligosakkaridien, jotka samanaikaisesti estävät angiogeenisten kasvutekijöiden vaikutusta ja heparanaasientsyymiä, käyttö olisi edullista monissa kliinisissä tilanteissa, esimerkiksi hoidettaessa erittäin metastasoivia kiinteitä kasvaimia ja nivelreumaa.

10 Aikaisempi kansainvälinen patenttihakemus nro PCT/AU88/00017 (julkaisu nro WO 88/05301) kuvaa sulfatoitujen polysakkaridien kuten hepariinin ja muunnetun hepariinin, fukoidiinin, pentosaanisulfaatin, dekstraanisulfaatin ja karrageeni-

lambdan, jotka salpaavat tai estävät heparanaasin vaikutusta, käyttöä eläin- tai ihmispotilaan antimetastaattisessa ja/tai anti-inflammatorisessa hoidossa.

15 Esillä olevaan keksintöön johtaneessa työssään keksinnön tekijät valmistivat sulfatoituja oligosakkarideja käyttämällä joko luonnossa esiintyviä oligosakkarideja tai täysin synteettisiä oligosakkarideja, jotka sisälsivät heksoosia sisältäviä homopolymeerejä. Eräiden näistä yhdisteistä on osoitettu olevan voimakkaita

20 ihmisen angiogeneesin, kasvainmetastaasien ja tulehduksen estäjiä. Saadut tulokset ovat yhdenmukaisia sulfatoitujen oligosakkaridien kanssa niiden omatessa biologisia vaikutuksia estämällä angiogeenisten kasvutekijöiden vaikutusta ja/tai heparanaasin toimintaa, ja tutkimuksessa saatiin eräitä sulfatoituja oligosakkarideja, jotka ovat sekä angiogeneesin että heparanaasin vaikutuksen voimakkaita estäjiä.

Erään aspektinsa mukaan esillä oleva keksintö koskee sulfatoituja oligosakkarideja,

25 joilla on yleinen kaava I:



jossa R_1 ja R_2 ja kukin R_x edustavat monosakkaridiyksikköjä, joista kaikki voivat olla samanlaisia tai erilaisia, vierekkäisten monosakkaridiyksikköjen liittyessä toisiinsa $1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$ ja/tai $1 \rightarrow 6$ glykosididoksilla, ja

30 n on kokonaisluku 1 - 6.

Tämän keksinnön mukaiset sulfatoidut oligosakkaridit perustuvat monosakkaridiyksikköjen, jotka voivat liittyä toisiinsa $1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$ ja/tai $1 \rightarrow 6$ glykosididoksilla, polymeereihin, jotka voivat koostua 3 - 8 monosakkaridiyksiköstä. Edulli-

sesti oligosakkaridit muodostuvat 3 - 6 monosakkaridiyksiköstä (n on 3 - 4). Polymerit voivat käsittää homopolymeerejä, jotka sisältävät vain yhdentyyppistä monosakkaridiyksikköä, tai heteropolymeerejä, jotka sisältävät kahden- tai useamman tyyppisiä monosakkaridiyksiköitä.

- 5 Monosakkaridiyksiköt, jotka liittyvät toisiinsa muodostaakseen oligosakkarideja, ovat edullisesti heksooseja ja ne voivat olla joko furanooseja, kuten fruktoosia, tai pyranooseja, kuten glukoosia, mannoosia, altroosia, alloosia, taloosia, galaktoosia, idoosia tai guloosia. Heksoosit voivat olla joko D- tai L-konfiguraatioissa.

- 10 Erään erityisaspektinsa mukaan esillä oleva keksintö koskee uusia synteettisiä oligosakkarideja, joilla on yleinen kaava II:



jossa kaikki R_y -ryhmät ovat samanlaisia ja kukin niistä edustaa monosakkaridiyksikköä, vierekkäisten monosakkaridiyksikköjen liittyessä toisiinsa 1→3, 1→4 ja/tai 1→6 glykosidisidoksilla; ja

- 15 n on jokin kokonaisluku 1 - 6.

Tämän erityisaspektinsa mukaan keksintö koskee myös sulfatoituja oligosakkarideja, joilla on edellä oleva yleinen kaava II.

- 20 Kaavan II mukaisissa homopolymeerioligosakkarideissa monosakkaridiyksikkö on edullisesti jokin heksoosi, kuten glukoosi, mannoosi, altroosi, alloosi, taloosi, galaktoosi, idoosi tai guloosi. Samoin edullisesti n on näissä oligosakkarideissa 1 - 4, edullisemmin 3 - 4.

Yleisten kaavojen I ja II mukaiset oligosakkaridit käsittävät myös yhdisteitä, joissa monosakkaridiyksiköt ovat johdettuja, erityisesti sellaisia, joissa yksiköt ovat monosakkaridien fosfaatti-, asetyyli- tai muu esterijohdoksia.

- 25 Tämän keksinnön mukaiset sulfatoidut oligosakkaridit voidaan yleensä valmistaa sulfatoimalla oligosakkarideja alalla *per se* tunnetuilla menetelmillä, jolloin saadaan niiden vastaavia O-sulfatoituja johdoksia. Esimerkkejä sopivista sulfatointimenetelmistä esitetään tuonnempana. Sulfatoituvat oligosakkaridit voivat olla luonnossa esiintyviä tuotteita, mukaanlukien luonnossa esiintyvät oligosakkaridit (esimerkiksi raffiinoosi ja stakyoosi), samoin kuin oligosakkarideja, jotka on valmistettu hajottamalla entsyymaattisesti tai kemiallisesti luonnossa esiintyviä oligosakkarideja (esimerkiksi maltotetroosi, maltopentoosi ja maltoheksoosi, glukotriooosi, gluko-
- 30

tetroosi ja glukopentoosi; kondroitiinitetra-, -heksa- ja -oktasakkaridit; ja *Pichia holstii* -hiivasta peräisin oleva mannopentoosifosfaatti).

5 Kuten edellä kuvattiin, tämän keksinnön alaan kuuluvilla sulfatoiduilla oligosakkarideilla on osoitettu olevan heparanaasia estävää ja/tai kasvutekijöitä estävää aktiivisuutta, ja vielä erään aspektinsa mukaan esillä oleva keksintö koskee edellä kuvattujen sulfatoitujen oligosakkaridien käyttöä antiangiogeenisena, antimetastaattisena ja/tai anti-inflammatorisena aineena lämminverisen eläinpotilaan (ihminen mukaanluettuna) hoidossa.

10 Esillä oleva keksintö koskeekin myös ihmispotilaan tai muun lämminverisen eläinpotilaan, joka tarvitsee tällaista hoitoa, hoitomenetelmää verisuonten uudiskasvua, metastaasien syntyä ja/tai tulehdusta vastaan, jossa menetelmässä potilaalle annetaan tehokas määrä vähintään yhtä edellä kuvattua sulfatoitua oligosakkaridia.

15 Aktiivinen komponentti annetaan terapeuttisesti tehokkaina määrinä. Terapeuttisesti tehokas määrä tarkoittaa sellaista määrää, joka tarvitaan halutun vaikutuksen saamiseksi ainakin osaksi tai kysymyksessä olevan hoidettavan tilan puhkeamisen viivytämiseksi, sen etenemisen estämiseksi tai sen puhkeamisen tai etenemisen pysäyttämiseksi kokonaan. Sellaiset määrät riippuvat kysymyksessä olevasta hoidettavasta tilasta, tilan vakavuudesta ja kysymyksessä olevan potilaan parametreista, ikä, fyysinen kunto, koko, paino ja rinnakkaishoito mukaanluettuina. Alaan perehtynyt tuntee nämä tekijät ja pystyy määrittämään ne pelkillä rutiinikokeilla. Yleensä on edullista, että käytetään maksimiannosta, toisin sanoen suurinta turvallista annosta järkevän lääketieteellisen harkinnan mukaan. Alan ammattilaiset ymmärtävät kuitenkin, että lääketieteellisistä, psykologisista ja käytännöllisesti katsoen mistä tahansa muusta syystä voidaan antaa myös pienempi annos tai siedettävä annos.

25 Keksintö koskee myös vähintään yhden edellä kuvatun sulfatoidun oligosakkaridin käyttöä valmistettaessa lääkettä ihmisen tai muun lämminverisen eläinpotilaan hoitamiseksi angiogeneesiä, metastaaseja ja/tai tulehdusta vastaan.

30 Lisäksi tämä keksintö koskee angiogeenin, metastaasien ja/tai tulehduksen vastaiseen hoitoon tarkoitettua farmaseuttista tai eläinlääkinnällistä koostumusta, joka käsittää vähintään yhden edellä kuvatun sulfatoidun oligosakkaridin yhdessä jonkin farmaseuttisesti tai eläinlääkintään hyväksytyyn kantajan tai laimenteen kanssa.

Alan ammattilaiset tuntevat hyvin sellaisten terapeuttisten koostumusten formuloinnin. Sopivia farmaseuttisesti tai eläinlääkinnällisesti hyväksytyjä kantajia ja/tai laimenteita ovat mitkä tahansa ja kaikki tavanomaiset liuotteet, dispergointiaineet,

täyteaineet, kiinteät kantajat, vesipitoiset liuokset, päällysteaineet, bakteereja tuhoavat ja sieniä tuhoavat aineet, isotoniset ja absorptiota säätelevät aineet ja vastaavat. Sellaisten aineiden käyttö farmaseuttisten ja eläinlääkinnällisten tehoaineiden kanssa on alalla tunnettua ja sitä kuvataan esimerkiksi teoksessa *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. painos, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA. Mitä tahansa tavanomaista ainetta voidaan käyttää esillä olevan keksinnön mukaisissa farmaseuttisesti ja eläinlääkintään hyväksyttävissä koostumuksissa, paitsi mikäli ne eivät sovi yhteen niiden kanssa. Koostumuksiin voidaan sisällyttää myös muita tehoaineita.

10 Erityisen edullista on formuloida seokset yksikköannosmuotoon annon helpottamiseksi ja annosten saamiseksi yhdenmukaisiksi. Tässä käytettynä yksikköannosmuoto tarkoittaa fyysisesti erillisiä yksikköannoksia, jotka ovat tarkoitettut hoidettaville ihmis- tai eläinlääkintään; kukin yksikkö sisältää tehoainetta ennalta määrätyn määrän, joka on laskettu niin, että se tuottaa halutun hoitovaikutuksen, liitettynä haluttuun farmaseuttisesti tai eläinlääkintään hyväksytyyn kantajaan ja/tai laimenteeseen.

15 Keksinnön mukaisten uusien annosyksiköiden määrittelyn sanelevat (a) tehoaineen ainutlaatuiset ominaisuudet ja saavutettava terapeuttilinen erityisvaikutus ja (b) sellaisen määrättyyn hoitoon tarkoitettun tehoaineen kompondointitekniikan luonnolliset rajoitukset ja ne ovat suoraan riippuvaisia näistä seikoista.

20 Tämän keksinnön mukaisia sulfatoituja oligosakkarideja voidaan käyttää hoidettaessa angiogeneesistä riippuvaisia tauteja, mukaanlukien kiinteiden kasvainten kasvamiseen, proliferatiivisiin retinopatioihin ja nivelreumaan liittyvä verisuonten uudiskasvu, sekä hoidettaessa tulehdussairauksia ja tiloja, joissa sulfatoitujen oligosakkaridien heparanaasia estävä vaikutus olisi erityisen hyödyllinen estämässä leukosyyttien infiltroitumista, mukaanluettuina krooniset tulehdussairaudet, joissa leukosyyttien infiltroituminen on eräs avainseikka, kuten nivelreuma, multippeliskleroosi, insuliinista riippuvainen diabetes mellitus, tulehdukselliset vatsataudit, kuten ulseratiivinen koliitti ja Chronin tauti, vierassiirteen hyljintä ja krooninen astma.

30 Kaikkiällä tässä patenttiselityksessä, jollei yhteys muuta edellytä, verbi "käsittää" tai sen sellaiset variaatiot kuten "käsittävät" ja "käsittäen" on ymmärrettävä siten, että ne sisältävät määritellyn kokonaisuuden tai kokonaisuusryhmän, mutta eivät sulje pois mitä tahansa muuta kokonaisuutta tai kokonaisuusryhmää.

- Kuten edellä laajasti kuvailtiin, esillä oleva keksintö koskee sulfatoituja oligosakkarideja ja niiden käyttöä antiangiogeenisinä, antimetastaattisia ja/tai anti-inflammatorisina aineina. Eräitä oligosakkarideja voidaan hankkia luonnon lähteistä myöhempää sulfatointia varten, mutta erittäin suositeltava on yksinkertainen
- 5 menettely ketjunpituudeltaan ja stereokemialtaan määrättyjen oligosakkaridien sulfatoimiseksi. Esillä oleva keksintö tuo käyttöön parannetun menetelmän heksoosisokerioligomeerien syntetisoimiseksi ja eristämiseksi yksinkertaisista lähtöaineista hyvinä saantoina ja tässä menetelmässä näiden oligomeerien sokerimonomeerit sidotaan toisiinsa 1→3, 1→4 ja/tai 1→6 -sidoksilla. Tämä
- 10 heksoosisokerioligomeerien valmistusmenetelmä on täysin päinvastainen kuin tapa, jolla sellaisia sokerioligomeerejä on aikaisemmin valmistettu, siinä mielessä, että saadaan hyviä saantoja, oligomerisoitumisaste on helposti säädeltävissä ja tällä menetelmällä saadut tuotteet ovat homologisia lineaarisia oligomeerejä, jotka on helppo eristää ja puhdistaa yksinkertaisia kromatografiamenetelmiä käyttäen.
- 15 Tiede- ja patenttikirjallisuudesta voidaan löytää monia esimerkkejä, joissa kuvataan sokeripolymeerien ja -oligomeerien valmistusta. Esimerkiksi eräässä yleisesti käytetyssä menettelytavassa muuntamatonta sokerimonomeeriä, joko yksinään tai liuotteen läsnäollessa, voidaan kuumentaa jonkin katalyytin läsnäollessa, jolloin saadaan haarautuneita ja lineaarisia polymeerituotteita, joissa on erilaisia ja
- 20 toisinaan huonosti määriteltäviä kemiallisia sidoksia (22, 23). Toinen menetelmä, jossa sokeri sulatetaan kationinvaihtohartsien läsnäollessa (24), tuottaa myös suurimolekyylipainoisia voimakkaasti haarautuneita polymeerejä. Näissä kahdessa esimerkissä polymeerien muodostuessa häviää samalla yksi vesimolekyyli kutakin muodostunutta polymeerisidosta kohti. Eräässä toisessa esimerkissä tunnetusta vaihepolymerointimenetelmästä käytetään Koeningsin-Knorrin reaktiota, jossa
- 25 sokerit, joissa on ei-hydroksyyli-ryhmiä (kuten esimerkiksi bromi- tai klooriatomi) positiossa 1 ja suojaavia ryhmiä (kuten esimerkiksi asetyyli) muissa sokerihydroksyyli-ryhmissä, saatetaan reagoimaan positiossa 1 jonkin toisessa sokerissa olevan hydroksyyli-ryhmän kanssa (24). Näissä menetelmissä menetetään
- 30 muu molekyyli kuin vesi, esimerkiksi HBr, polymeerisidoksen muodostumisen aikana. Tämä oligosakkaridien valmistusmenetelmä on aikaa vievä ja siinä joudutaan valmistamaan monimutkaisia lähtöaineita ja se tuottaa huonoja kokonaistuloksia (25).
- 35 Samaten on tunnettua, että heksoosisokeri, jossa on jokin primaarinen alkoholiryhmä hiilessä 6 ja O-suojaryhmiä (kuten asetyyli) positioissa 2, 3 ja 4 ja jokin lähtevä ryhmä, kuten bromi, positiossa 1, kondensoituvat itsestään, erityisesti jonkin sellai-

sen katalyytin kuten hopeaoksidin läsnäollessa, jolloin muodostuu 1,6 -sidottuja polymeerejä; joukko gentiodekstriinejä on valmistettu tällä tavalla 1-bromi-2,3,4-tri-O-asetyyli- α -D-glukoosista; oligosakkaridien saannot olivat kuitenkin huonoja sen vuoksi, että muodostui 1,6-anhydro- β -D-glukoosia, joka syntyi molekyyllinsisäisestä kondensaatiosta; dimeerin (14 %) ja trimeerin (22 %) saannot olivat kehoja ja tetrimeerin ja pentameerin saannot (≤ 5 %) olivat huonompia ja heksameeriä eristettiin vain 1 %:n saantona (26).

Tuoreemmissa julkaisuissa kuvataan 1,6-sidottujen β -pyranosyyliyksikköjen (27) ja D-dekstraanin polymeerien kemiallisia synteesejä, jotka tapahtuvat anhydrosokerijohdoksien renkaanavautumispolymeroitumisen avulla. Tämän menetelmä haittana on huomattavaa työpanosta vaativa anhydrosokerilähtöaineen valmistus eikä ole myöskään näyttöä siitä, että oligosakkarideja voitaisiin valmistaa helposti tällä menetelmällä, vaikka reaktiot toteutettaisiin esimerkiksi -60°C :ssa. Eräässä toisessa menetelmässä on käytetty 1,2,3,4-tetra-O-asetyyli- β -D-glukoosin happokatalysoitua sulapolymerointia 1,6'-sidottujen oligosakkaridiasetaattien seoksen valmistamiseksi, jonka deasetyloinnin ja kromatografiatutkimuksen jälkeen osoitettiin sisältävän pääasiassa mono- ja disakkarideja, nimittäin glukoosia (15 %), levoglukosaania (4 %) ja gentiobioosia (16 %), kun sen sijaan oligosakkaridisaanto oli ei-hyväksyttävän huono, erityisesti gentiotriosin (4 %) ja gentiotetroosin (0,6 %) (29). Tätä menetelmää kuvattiin myöhemmin yksityiskohtaisemmin (30) ja vaikka polymeerituotteiden saanto oli hieman parantunut, tuloksena oli kuitenkin vain hyvin kehoja saantoja odotetuista oligomeereistä.

Kirjallisuuden perusteella näyttää siis siltä, että vaikka oligosakkaridien valmistamiseksi on jo olemassa useita menettelytapoja, ei tähän mennessä ole kuvattu mitään menetelmää homo-oligosakkaridien valmistamiseksi hyvällä saannolla helposti saatavissa olevasta ja huokeysta lähtöaineesta.

Tähän keksintöön johtaneessa työssä havaittiin, että spesifejä heksopyrano-oligosakkarideja voidaan syntetisoida hyvinä saantoina helposti saatavilla olevista ja huokeysta lähtöaineista. Keksinnön tämän aspektin mukaan kysymyksessä on heksopyrano-oligosakkaridien valmistusmenetelmä, jossa kuumennetaan heksoosin asetyyli- tai jotakin muuta esterijohdosta jossakin inertissä liuotteessa alennetussa paineessa ja jonkin Lewisin hapon tai muun katalyytin läsnäollessa.

Tämän menetelmän mukaan heksoosisokerijohdoksien, mukaanluettuina glukoosin, mannoosin, galaktoosin, altroosin, taloosin, guloosin, idoosin ja alloosin 1,2,3,4-tetra-O-asetyylijohdokset, mutta rajoittumatta niihin, voidaan saada oligomerisoitu-

maan hallitusti, jolloin saadaan O-asetyloituja heksoosioligosakkarideja. Tässä menetelmässä oligomerisointumisasastetta (ketjun pituutta) voidaan helposti säädellä säätämällä lämpötilaa, jossa oligomerisaatioreaktio tapahtuu, ja muuttamalla aikaa, jonka reaktion annetaan edetä. Oligomerisaatioreaktion jälkeen raakatuoteseokselle voidaan suorittaa lisäasetylointi oligosakkaridien loppujen vapaiden hydroksyyli-

5 ryhmien asetyloimiseksi. Asetyloidut oligosakkaridit voidaan sitten helposti erottaa adsorptiokromatografian avulla. Asetyyli-ryhmät absorboivat ultraviolettivaloa, mikä helpottaa spektrofotometrian käyttöä asetyloitujen oligosakkaridien tunnistamiseen, kun ne eluoituvat peräjälkeen kolonnista. Asetyyli-ryhmät voidaan myös poistaa

10 oligosakkaridiseoksesta ja saadut oligosakkaridit erottaa koon mukaan geelisuodatus(koekeskluusio)kromatografialla.

Tässä kuvatuissa esimerkeissä sulfatoidut oligosakkaridit erotetaan ja käytetään vastaavina natriumsuoloina. On selvää, että muita farmaseuttisesti hyväksytyjä suoloja, kuten kalsiumsuoloja, tai farmaseuttisesti hyväksyttäviä amiinisuoloja voidaan erottaa ja käyttää vastaavalla tavalla. Kun tässä siis viitataan "sulfatoituihin oligosakkarideihin", niiden on tarkoitettu kattavan myös sulfatoitujen oligosakkaridien sellaiset natrium- tai muut farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat.

15

Esillä olevan keksinnön muita tunnusmerkkejä kuvataan täydellisemmin seuraavissa esimerkeissä. On kuitenkin selvää, että tämä yksityiskohtainen kuvaus sisällytetään tähän pelkästään esimerkkinä esillä olevasta keksinnöstä eikä sen tulisi käsittää millään tavalla rajoittavan edellä selostetun keksinnön laajempaa kuvausta.

20

Esimerkit 1, 2 ja 3 kuvaavat synteettisten oligosakkaridien valmistusta tässä kuvatulla uudella menetelmällä, esimerkit 4, 5 ja 6 ovat esimerkkejä oligosakkaridien sulfatointimenetelmistä ja esimerkki 7 on esimerkki sulfatoitujen oligosakkaridien käytöstä antiangiogeenisinä, antimetastaattisina ja/tai anti-inflammatorisina aineina. (Esimerkeissä 1 ja 2 "EM" tarkoittaa "ei määritetty").

25

Liitteenä olevissa piirustuksissa:

Kuvio 1 esittää maltoheksosin vaikutusta ihmisen angiogeneesiin *in vitro*. Ylempi kuvio on digitaalikuva vertailuangiogeneesistä 14 vuorokautta viljelyn aloituksen jälkeen. Alempi kuvio kuvaa angiogeneesiä 20 µg:n/ml maltoheksosisulfaattia läsnäollessa.

30

Kuvio 2 esittää maltoosisulfaatin (□), maltotetroosisulfaatin (O) ja maltoheksosisulfaatin (■) eri pitoisuuksien vaikutusta ihmisen angiogeneesiin *in vitro*. Tuloksia,

jotka saatiin angiogeenivasteen digitaalikuvista 14 vuorokautta viljelyn aloittamisen jälkeen. Kukin arvo on keskiarvo \pm keskivirhe (n=4).

Kuvio 3 esittää *Pichia holstiista* peräisin olevan sulfatoitujen mannopentoosifosfaatin eri pitoisuuksien ($\mu\text{g/ml}$) vaikutusta ihmisen angiogeneesiin *in vitro*. Tuloksia, jotka saatiin angiogeenivasteen digitaalikuvista 19 vuorokautta viljelyn aloittamisen jälkeen. Kukin arvo on keskiarvo \pm keskivirhe (n=4).

Kuvio 4 esittää ketjunpituudeltaan erilaisten sulfatoitujen maltoosioligosakkaridien vaikutusta rotan maitorauhasadenokarsinooman 13762 MAT metastaaseihin. Vertailueläimet saivat 13762 MAT -soluja ilman oligosakkaridia. Ryhmässä A käsitellyt eläimet saivat 2 mg, i.v., kutakin yhdistettä kasvainsolujen ruiskutushetkellä. Ryhmässä B käsitellyt eläimet saivat 4 mg, ihon alle, kutakin yhdistettä kasvainsolujen ruiskutushetkellä. Pystysuorat palkit kuvaavat keskiarvojen keskivirheitä.

Kuviossa 5 on määritetty ketjunpituudeltaan erilaisten sulfatoitujen maltoosioligosakkaridien kykyä estää solun pinnan heparaanisulfaattien sitoutumista BALB/c 3T3-solujen pinnalle immobilisoituun FGF:ään. Sitoutuneiden 3T3-solujen määrä määritettiin värjäämällä bengaalinpunaisella ja mittaamalla värin absorbanssi aallonpituudella 540 nm. Eri maltoosioligosakkaridien sulfatointiaste on lueteltu taulukossa 2.

Kuvio 6 kuvaa maltoheksoosisulfaatin sulfatointiasteen vaikutusta sen kykyyn estää rotan maitorauhasen adenokarsinooman 13762 MAT metastaaseja. Vaaka-akselilla olevat numerot tarkoittavat sulfaattiryhmien lukumäärää/maltoheksoosimolekyyli. Vertailueläimet saivat kasvainsoluja ilman yhdistettä. Oligosakkaridit annettiin annoksena 2 mg/rotta, i.v. kasvainsolujen ruiskutuksen hetkellä. Pystysuorat palkit kuvaavat keskiarvojen keskivirheitä.

Kuvio 7 kuvaa maltoheksoosin, jossa on eri lukumäärä sulfaattiryhmiä/molekyyli, vaikutusta *in vitro* ihmisen angiogeneesiin. Oligosakkaridit lisättiin pitoisuutena 200 $\mu\text{g/ml}$ ja koe suoritettiin seerumittomassa väliaineessa. Tässä kokeessa saatiin samankaltainen angiogeeninen vaste riippumatta siitä, suoritettiin koe seerumia sisältävässä (20 % FCS) tai seerumittomassa (ei FCS:ä) väliaineessa. Maltoheksoosi, jossa on 20 sulfaattiryhmää/molekyyli, edustaa maksimaalisesti sulfatoitua molekyyliä. Tulokset keskiarvoja \pm keskivirhe neljästä määrittäyksestä.

Kuvio 8 esittää erilaista mannoosia sisältävien sulfatoitujen oligosakkaridien vaikutusta *in vitro* ihmisen angiogeneesiin. Sulkeissa olevat arvot tarkoittavat oligosakkaridien sulfatointi-%. Oligosakkarideja lisättiin pitoisuutena 200 $\mu\text{g/ml}$ ja koe suoritettiin seerumia sisältävässä väliaineessa. Tulokset ovat neljän määrittäyksen keskiarvo \pm keskivirhe.

Kuvio 9 esittää ketjunpituudeltaan erilaisten sulfatoitujen mannoosioligosakkaridien vaikutusta rotan maitorauhasen adenokarsinooman 13762 MAT metastaasiin. Sul-

keissa olevat arvot tarkoittavat oligosakkaridien sulfatointiprosenttia. Vertailueläimet saivat 13762 MAT -soluja ilman oligosakkaridia. Käsitellyt eläimet saivat ihon alle joko 2 mg (A) tai 4 mg (B) kutakin yhdistettä välittömästi kasvainsolujen i.v. ruiskeen jälkeen. Pystysuorat palkit kuvaavat keskiarvojen keskivirheitä.

- 5 **Kuvio 10** kuvaa ketjunpituudeltaan erilaisten sulfatoitujen galaktoosi- ja glukoosioligosakkaridien vaikutusta rotan maitorauhasadenokarsinooman 13762 MAT metastaasiin. Sulkeissa olevat arvot tarkoittavat oligosakkaridien sulfatointiprosenttia. Vertailueläimet saivat 13762 MAT -soluja ilman oligosakkaridia. Käsitellyt eläimet saivat ihon alle 2 mg kutakin yhdistettä välittömästi kasvainsolujen i.v. ruiskeen jälkeen.
- 10

Esimerkki 1

- Mannoosioligosakkaridit saatiin seuraavalla tavalla: 1,2,3,4-tetra-O-asetyylimannosi (31) (15,0 g, 43 mmol) ja sinkkikloridi (1,5 g) sekoitettiin perusteellisesti tetrametyleenisulfonissa (7 ml), tätä seosta kuumennettiin alennetussa paineessa samalla sekoittaen noin 110°C:ssa 6 tuntia; tässä vaiheessa reaktiomassa oli kovettunut ja höyryn (etikkahappoa) kehittyminen oli lakannut. Koko reaktioajan reaktioastian ja alipainelähteen välillä oli natronkalkkiputki. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä ja osa (11,0 g) tuoteseoksesta liuotettiin kuivaan pyridiiniin (20 ml) ja tähän liuokseen lisättiin etikkahappoanhydridiä (2 ml), tämä seos suojattiin ilmakehän kosteudelta ja sitä kuumennettiin noin 50°C:ssa samalla sekoittaen 2 tuntia. Jäähdyttämisen jälkeen lisättiin etanolia (10 ml) ja seoksen annettiin seistä 2 tuntia. Muodostunut pyridiini, etanoli ja mahdollinen etyylisetaatti haihdutettiin pois alipaineessa ja jäännös pestiin perusteellisesti vedellä sinkkikloridin, tetrametyleenisulfonin ja pyridiinin poistamiseksi. Jäännös liuotettiin dikloorimetaaniin, pestiin vedellä ja orgaaninen kerros kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä. Oligosakkaridijohdokset erotettiin ensiksi kahdeksi fraktioksi ohjaamalla dikloorimetaaniliuos lyhyeen (4 x 40 cm) silikageeli 60 (130 g) -kolonniin, joka eluotitiin ensin kloroformilla ja sitten asetonilla. Kloroformilla eluointi tuotti seoksen, jossa oli täysin asetyloitunutta monosakkaridia ja oligomeerejä, jotka sisälsivät 3 - 5 yksikköä mannoosia (seos A). Sen jälkeen suoritettu eluointi asetonilla tuotti seoksen, jossa oli täysin O-asetyloituneita oligomeerejä, jotka sisälsivät pääasiassa 6 - 12 mannoosiyksikköä per molekyyli (seos B).
- 15
- 20
- 25
- 30

- Seosta A (4 g) syötettiin kolonniin (3,3 x 135 cm), joka oli pakattu ohutlevykromatografiaan kelpaavalla silikageelillä (H). Kolonni eluotitiin asetonipetrolietterillä (kiehumispiste 60 - 80°C) gradientilla, joka lähti 1:5:stä ja jossa asetonin prosenttiosuus kasvoi, kunnes saavutettiin lopullinen suhde 1:1. Virtausnopeus oli
- 35

±0,5 ml/min. Keräämällä ja yhdistämällä sopivat fraktiot (määritettiin silikageeli-ohutlevykromatografialla) ja poistamalla liuote alipaineessa saatiin täysin asetyloituneita mannoosioligosakkarideja 1a - 1d seuraavasti [n = mannoositähteiden lukumäärä; saanto, molekyylirotaatio (c= 2, CHCl₃): 1a (3; 0,7 g; 4,2 %, [α]²⁷_D=EM); 1b (4; 4,1 g; 8,4 %, [α]²⁷_D=+50); 1c (5; 1,2 g; 7,9 %, [α]²⁷_D=+47,3); 1d (6; 0,8 g; 5,2 %, [α]²⁷_D=+36,0). Seos B (7,0 g) kromatografoitiin samalla tavalla kuin seos A, mutta eluointigradiendi lähti asetoni/petrolieetteri-suhteesta 4:5 (kiehumispiste 60 - 80°C) ja asetonin prosenttiosuus nousi, kunnes se oli 100 %. Tällä tavalla saatiin täysin O-asetyloituneet mannoosioligosakkaridit 1d - 1j seuraavasti [n = mannoositähteiden lukumäärä; saanto, molekyylirotaatio (c= 1, CHCl₃): 1d (6; 1,6 g; 10,4 %, [α]²⁷_D=+EM); 1e (7; 3,2 g, 21,2 %, [α]²⁷_D=+50,0); 1f, (8; 0,5 g, 3,4 %, [α]²⁷_D=+47,0), 1g (9; 0,7 g, 4,7 %, [α]²⁷_D=+59); 1h (10; 0,9 g, 5,7 %, [α]²⁷_D=+54); 1i (11; 0,02 g, 0,1 %, [α]²⁷_D=+EM); 1j (12; 0,03 g, 0,2 %, [α]²⁷_D=+EM].

Yhdistettä 1a (1,55 g) liuotettiin kuivaan metanoliin (40 ml) ja 1M metanolinat-
 riummetoksidia (8,6 ml) lisättiin samalla sekoittaen huoneenlämpötilassa. Saatu
 sakka suodatettiin pois, pestiin perusteellisesti metanolilla ja kuivattiin. Tuote (2a;
 0,61 g, 70 %, [α]²⁷_D=+72°) identifioitiin mannotriooksi alkuaineanalyysillä (CHN-
 arvot olivat ±0,4 % odotetusta), elektrosumutusmassaspektrometrialla (M⁺504) ja
 NMR-spektroskopiolla. Oligomeerit 1b - 1j käsiteltiin samalla tavalla, jolloin saatiin
 seuraavat oligosakkaridit [n = mannoositähteiden lukumäärä; saanto % asetyloiduis-
 ta johdoksista, molekyylirotaatio (c=1, H₂O)]: 2b (4; 75 %, [α]²⁷_D=+78°); 2c (5;
 85 %, [α]²⁷_D=+80°); 2d (6; 98 %, [α]²⁷_D=84°); 2e (7; 98 %, [α]²⁷_D=86,3°); 2f (8; 99
 %, [α]²⁷_D=98,0°); 2g (9; 99 %, [α]²⁷_D=+106°); 2h (10; 99 %, [α]²⁷_D=+100°); 2i (11;
 98 %, [α]²⁷_D=EM); 2j (12; 98 %, [α]²⁷_D=EM).

Vaihtoehtoisesti nämä mannoosioligosakkaridit voidaan eristää geelisuodatuskroma-
 tografialla (kokoekskluusio). Asetyloitujen mannoosioligosakkaridien seos saatiin
 siis kuumentamalla samalla sekoittaen perusteellisesti 1,2,3,4-tetra-O-asetyyli-
 mannoosia (15,0 g, 43 mmol) ja sinkkikloridia (1,5 g) tetrametyleenisulfonissa
 (7 ml) alennetussa paineessa noin 110°C:ssa 6 tuntia, kuten edellä kuvattiin. Reak-
 tiotseoksen annettiin jäähtyä ja vettä (50 ml) lisättiin ja reaktioseosta sekoitettiin
 huoneenlämpötilassa 5 minuuttia ja vesikerros heitettiin pois. Tämä pesumenettely
 toistettiin, ja massa liuotettiin sen jälkeen kloroformiin, pestiin vedellä ja kuivattiin
 vedettömän natriumsulfaatin päällä. Suodattamisen jälkeen kloroformi poistettiin
 alipaineessa, jolloin saatiin raaka asetyloitunut oligosakkaridiseos (11,3 g). Tämä
 seos liuotettiin isopropanoliin (20 ml) ja metanoliin (60 ml) ja sitten lisättiin 1M
 natriummetoksidia metanolissa (8 ml) ja seoksen annettiin seistä huoneenlämpöti-

lassa 1 tunti. Tuloksena oleva sakka suodatettiin pois ja pestiin metanolilla (30 ml) kahdesti. Kuivaamisen jälkeen tämä tuote (6,5 g) pantiin hienolaatuista P2-geeliä (BioRad) sisältävän geelisuodatuskolonnin yläpäähän (vaipallinen, 5 x 90 cm), joka oli stabilisoitu ajamalla kaksi päivää vedellä (virtausnopeus 0,5 ml per min) 5 60°C:ssa. Kolonni eluointiin vedellä virtausnopeudella 0,5 ml per minuutti. Kolonnista eluoituvat tuotteet identifioitiin piikkeinä differentiaalirefraktometrialla ja fraktiota koottiin sen mukaisesti. Tällä tavalla koottiin fraktioita, jotka vastasivat 11 erillisen piikin alla olevia alueita. Kukin näistä fraktioista kromatografoitiin uudelleen samanlaisessa P2-geelikolonnissa, joka pidettiin 60°C:ssa, ja eluointiin vedellä virtausnopeudella 0,5 ml/min. Näin esimerkiksi fraktio, joka identifioitiin mannopentoosiksi (0,9 g) ensimmäisestä geelisuodatusajosta, kromatografoitiin uudelleen, jolloin saatiin pääkeskipiikki, jonka molemmin puolin oli olkapäät. Keskipiikissä eluoituva tuote eristettiin poistamalla vesi alipaineessa, jolloin saatiin (0,5 g) materiaali, joka kromatografoitiin uudelleen samanlaisessa P2-geelikolonnissa 60°C:ssa 10 virtausnopeudella 0,3 ml/min. Tällä tavalla saatiin mannopentoosi (0,3 g), joka on identtinen edellä mainitun 2c:n kanssa. Todettiin: C 38,4; H 6,7; C₃₀H₅₂O₂₆ · 6H₂O edellyttää: C 38,5; H 6,8 %. Typpiärvot olivat 0 % todettu ja 0 % odotettu.

Yhdisteen todettiin HPLC:llä olevan olennaisen puhdasta. Tämä määritettiin Dionex HPLC-systeemillä, jonka laitteistokokoonpano oli seuraava:

20 **Kolonni:** Code - CPMA1#1291 (+guard#1172). Kvaternaarinen ammoniumioninvaihtokolonni.

Ilmais: Sähkökemiallinen ilmais (ED40:IAMP).

Virtausnopeus: 1 ml/min.

Liutteet: Liuos A: 0,1M NaOH

25 Liuos B: 1M asetaatti 0,1M NaOH:ssa.

Gradientti: Aika (min) %A %B Toiminto

0 95 5 Eluointi

20 90 10 Eluointi

25 0 100 Eluointi/Pesu

30 30 0 100 Eluointi/Pesu

Sähkösumutusmassaspektrometria osoitti tämän yhdisteen massaksi M⁺ 828, joka on mannopentoosin oikea molekyylipaino. Samalla tavalla eristettiin mannotrioosi, mannotetroosi, mannoheksaosi ja mannopentoosi, jotka olivat identtisiä edellä mainittujen 2a:n, 2b:n, 2d:n ja 2e:n kanssa.

Esimerkki 2

- Tämä esimerkki osoittaa vaikutuksen, joka saadaan, kun polymerisaatioreaktio toteutetaan matalammassa lämpötilassa kuin esimerkissä 1. Glukoosioligosakkarideja saatiin polymeroimalla 1,2,3,4-tetra-O-asetyyliglukoosia samalla tavalla kuin mannoosioligosakkarideja, jotka valmistettiin edellä esimerkissä 1 kuvatulla menetelmällä, paitsi että tässä tapauksessa polymerisaatioreaktio toteutettiin 90°C:ssa 8 tuntia. Reaktioseos käsiteltiin kuten esimerkissä 1, ja tuotteet eristettiin pylväskromatografialla, jossa kolonni (7 cm x 155 cm) oli pakattu ohutlevykromatografiaan kelpaavalla silikageelillä (H). Käyttämällä samanlaisia eluointimenetelmiä kuin esimerkissä 1 saatiin täysin O-asetyloituneet glukoosioligosakkaridit 3a - 3e seuraavasti [n = glukoositähteiden lukumäärä; saanto; molekyylirotaatio (c=2, CHCl₃): 3a (3; 4,14 g; 24,9 %, [α]²⁷_D=+37,5°); 3b (4; 2,92 g, 18,4 %, [α]²⁷_D=+44°); 3c (5; 2,99 g, 19,1 %, [α]²⁷_D=+37,5°); 3d (6; 1,37 g, 8,9 %, [α]²⁷_D=+36°); 3e (7; 0,18 g, 1,2 %, [α]²⁷_D=+39°).
- Yhdistettä 3a (1,0 g) liuotettiin kuivaan metanoliin (30 ml), ja 1M metanolinatriummetoksidia (5,5 ml) lisättiin samalla sekoittaen huoneenlämpötilassa. Tuloksena oleva sakka suodatettiin pois, pestiin perusteellisesti metanolilla ja kuivattiin. Tuote (4a; [α]²⁷_D=68,5°) identifioitiin glukotrioksiksi alkuaineanalyysillä, sähkösumutusmassaspektrometrialla (M⁺ = 504) ja NMR-spektroskopiolla. Oligomeerit 4b - 4e käsiteltiin samalla tavalla, jolloin saatiin seuraavat glukoosioligosakkaridit [n = glukoositähteiden lukumäärä; saanto; molekyylirotaatio (c=2, H₂O)]: 4b (4; 85 %, [α]²⁷_D=+83°); 4c (5; 90 %, [α]²⁷_D=+84°); 4d (6; 90 %, [α]²⁷_D=+86°); 4e (7; 89 %, [α]²⁷_D=+92,5°).
- Vaihtoehtoisesti nämä glukoosioligosakkaridit voidaan eristää geelisuodatus(kokoekskluusio)kromatografialla. Niinpä saatiinkin asetiloituneita glukoosioligosakkarideja, kun kuumennettiin perusteellisesti sekoitusta, joka sisälsi 1,2,3,4-tetra-O-asetyyliglukoosia (156,0 g, 43 mmol) ja sinkkikloridia (1,5 g) tetrametyleenisulfonissa (7 ml), alipaineessa noin 110°C:ssa 6 tuntia edellä kuvatulla tavalla. Reaktiomassa liuotettiin dikloorimetaaniin, pestiin vedellä ja kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä. Dikloorimetaani poistettiin alipaineessa ja tuote punnittiin ja liuotettiin isopropanoliin (20 ml) ja metanoliin (60 ml) ja sitten lisättiin 1M natriummetoksidia metanolissa (9 ml), ja seoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa 1 tunti. Tuloksena oleva sakka suodatettiin pois ja pestiin kahdesti metanolilla (30 ml). Osa (7,6 g) tästä seoksesta liuotettiin veteen (10 ml) ja pantiin vesivaipalla varustettuun 5 x 90 cm:n kromatografiakolonneihin, joka oli pakattu hienolaatuisella P2-kokoekskluusiogeelillä (BioRad). Kolonni oli pakattu, esikuumennettu ja sitä oli

ajettu 60°C:ssa kahden vuorokauden ajan ennen käyttöä. Kun glukoosioligosakkaridiseos oli pantu kolonniin, se pidettiin 60°C:ssa ja eluoiitiin vedellä (1 ml/min). Kolonnista eluoiutuvat tuotteet identifioitiin piikkeinä differentiaalirefraktometrialla ja fraktiot otettiin talteen sen mukaisesti. Jokainen näistä fraktioista kromatografoitiin uudelleen samanlaisessa P2-geelikolonnissa 60°C:ssa ja eluoiitiin vedellä virtausnopeudella 0,5 ml/min. Niinpä esimerkiksi fraktio, joka identifioitiin glukopentoosia (0,59 g) vastaavaksi, kromatografoitiin uudelleen, jolloin saatiin pääasiallinen keskipiikki, jossa oli olka kummallakin sivulla. Keskipiikissä eluoiutuva tuote eristettiin poistamalla vesi alipaineessa, jolloin saatiin (0,3 g) materiaalia, joka kromatografoitiin uudelleen samanlaisessa P2-geelikolonnissa 60°C:ssa virtausnopeudella 0,3 ml/min. Tällä tavalla saatiin glukopentoosi (0,2 g), joka oli samanlainen edellä mainitun 4c:n kanssa. Samalla tavoin eristettiin glukotriooosi, glukotetroosi, glukoheksoosi ja glukohheptoosi, jotka olivat identtiset edellä mainittujen 4a:n, 4b:n, 4d:n ja 4e:n kanssa.

15 Esimerkki 3

Muiden heksoosisokereiden, kuten galaktoosin, altoosin, taloosin, guloosin, idoosin ja alloosin oligosakkarideja voidaan valmistaa esimerkeissä 1 ja 2 kuvatuilla menetelmillä.

Esimerkiksi galaktoosioligosakkarideja saatiin seuraavalla tavalla: 1,2,3,4-tetra-O-asetyyyligalaktoosia (21,0 g) ja sinkkikloridia (2,1 g) sekoitettiin perusteellisesti tetrametyleenisulfonissa (10 ml), tätä seosta kuumennettiin alipaineessa samalla sekoittaen noin 90°C:ssa 17 tuntia; tässä vaiheessa reaktiomassa oli kovettunut ja höyryn (etikkahappoa) kehittyminen oli lakannut. Koko reaktioajan reaktioastian ja alipainelähteen välillä oli natronkalkkiputki. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä, reaktiomassa liuotettiin sen jälkeen dikloorimetaaniin, pestiin vedellä ja kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä. Dikloorimetaani poistettiin alipaineessa ja tuote punnittiin ja liuotettiin isopropanoliin (30 ml) ja metanoliin (70 ml), ja sitten siihen lisättiin 1M natriummetoksidia metanolissa (10 ml) ja seoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa 1 tunti. Tuloksena saatu sakka suodatettiin pois ja pestiin kahdesti metanolilla (30 ml). Tämä seos erotettiin geelisuodatuskromatografialla kuten kuvattiin mannoosi- ja glukoosipolymeerien kohdalla edellä esimerkeissä 1 ja 2. Kolonnista eluoiutuvat tuotteet identifioitiin piikkeinä differentiaalirefraktometrialla ja fraktiot otettiin talteen sen mukaisesti. Tällä tavalla koottiin 8 fraktiota. Seitsemän näistä fraktioista kromatografoitiin uudelleen kahdesti samanlaisessa P2-geelikolonnissa 60°C:ssa ja eluoiitiin vedellä virtausnopeudella 0,5 ml/min ensimmäisessä ajossa ja 0,3 ml/min toisessa ajossa. Tällä tavalla saatiin seuraavat galaktoosioligosakkaridit: galaktotri-

oosi, 1,03 g, 5,3 %; galaktotetroosi, 1,15 g, 6,0 %; galaktopentoosi, 1,21 g, 6,3 %; galaktoheктоosi, 4,25 g, 22,1 %; galaktoheптоosi, 2,11 g, 11 %; galakto-okтоosi, 1,91 g, 9,9 % ja galaktononoosi, 0,08 g, 0,4 %.

Esimerkki 4

5 Liuokseen, jossa oli rikkiatriokside-pyridiinikompleksia (0,8 g) (Aldrich) vastatila-
tussa DMF:ssä (1 ml) 80°C:ssa, lisättiin tiputtamalla mannopentoosin (2c) (0,1 g)
liuos kuivassa pyridiinissä (3 ml) ja tätä seosta kuumennettiin 80°C:ssa vielä 90 mi-
nuuttia. Supernatantti dekantoitiin vielä lämpimänä ja tahmea jäännös pestiin perus-
teellisesti metanolilla (2 ml) kolme kertaa. Kun jäännösmetanoli oli dekantoitu, tuote
10 liuotettiin veteen (5 ml) ja neutraloitiin (pH ~6:een) bariumasetaatilla (noin 0,4 g
2 ml:ssa vettä) voimakkaasti sekoittaen. Sentrifugoinnin jälkeen (3 000 x g) päällä
oleva liuos dekantoitiin ja säilytettiin ja saostunut bariumsulfaattipelletti pestiin pe-
rusteellisesti vedellä (3 x 10 ml). Säilytetty supernatantti ja pesuvedet yhdistettiin ja
15 pantiin DOWEX 50W-X8-400 kationinvaihtohartsikoloniin (H⁺-muoto). Kolonnia
eluoitiin vedellä, kunnes eluaatti oli neutraali. Eluaattia (~50 ml) sekoitettiin ja neut-
raloitiin (pH ~7:ään) natriumasetaatilla (0,7 g). Liuos laimennettiin asetonilla (200
ml) ja sentrifugoitiin (1 750 x g) tuotteen erottamiseksi. Pelletti hienonnettiin jau-
hemaiseksi murskaamalla metanolin alla ja sitten sitä sekoitettiin vielä metanolin
alla ja suodatettiin sitten pois. Kiinteä aine pestiin useita kertoja metanolilla puhtaan
20 (ei epäorgaanisia suoloja) yhdisteen (0,2 g; 66 %) saamiseksi. Tuote ei ollut konta-
minoitunut bariumionilla (mikroanalyysillä ja liekki-ionisaatiolla määritettynä) eikä
typellä (mikroanalyysi).

Tuotteessa, sulfatoidussa mannopentoosissa, todettiin 11 mahdollisesta 17 positiosta
sulfatointuneiksi. Todettiin C 14,2; H 3,0; S 14,1; Na 7,3. C₃₀H₆₀O₅₉S₁₁Na₆. 36 H₂O
25 edellyttää C 14,1; H 5,2; S 13,8; Na 7,2 %. Typpi- ja bariumarvot olivat: 0 % todettu
ja 0 % odotettu.

Esimerkki 5

30 Seokseen, joka sisälsi rikkiatriokside-pyridiinikompleksia (Aldrich Chemical Compa-
ny) (4 g) kuivassa DMF:ssä (5 ml), lisättiin kuivaa pyridiiniä (10 ml) kuivassa typpi-
ilmakehässä. Tämä seos lämmitettiin 50°C:seen ja sitä sekoitettiin nopeasti samalla
kun lisättiin yhtenä eränä glukoheksoosia (4d) (0,5 g), joka oli eristetty edellä esi-
merkissä 2 kuvatulla tavalla. Pyridiiniä lisättiin vielä (5 ml) ja sitten seosta kuumen-
nettiin samalla jatkuvasti sekoittaen 80°C:ssa 90 minuuttia. Sitten reaktioseos pi-
dettiin 4°C:ssa yön yli. Neste dekantoitiin reaktioastiasta, metanolia (3 ml) lisättiin

ja puolikiinteä massa hajotettiin ja sekoitettiin perusteellisesti metanolin kanssa. Asettumisen jälkeen metanoli dekantoitiin ja tämä menettely toistettiin. Vettä (5 ml) lisättiin jäljellä olevaan kiinteään aineeseen ja saatu liuos pantiin 50 ml:n koeputkeen. Reaktioastia huuhdottiin lisävedellä (5 ml), joka yhdistettiin ensimmäiseen liuokseen. Saadun liuoksen pH säädettiin noin 7 - 8:aan 40-prosenttisella NaOH:lla, minkä jälkeen lisättiin metanolia (40 ml). Tuloksena olevaa sameaa liuosta sentrifugoitiin (3 000 x g) 25 minuuttia, ja sakasta dekantoitui kirkas liuos. Kiinteä jäännös liuotettiin taas veteen (10 ml), metanolia (40 ml) lisättiin ja putkea sentrifugoitiin kuten edellä. Kun kirkas pinnalla oleva neste oli dekantoitunut, kiinteä aine luotettiin veteen (10 ml) ja ajettiin P2-geeliulossuolauskolonnin läpi (2,5 cm x 250 cm; hienolaatuinen P2-geeli - BioRad), jolloin saatiin 1,6-glukoheksoosin sulfatoidun johdoksen odotettu natriumsuola.

Esimerkki 6

Vaikka esimerkeissä 1, 2 ja 3 kuvattiin heksoosihomopolymeerien synteesi, on useimpia oligosakkaridirakenteita tavallisesti äärimmäisen vaikea syntetisoida. Yksinkertainen ratkaisu onkin sulfatoida määrätyn rakenteen omaavia luonnon lähteistä peräisin olevia oligosakkarideja. Tässä esimerkissä käytettyjä luonnon oligosakkarideja oli kahta luokkaa. Ensimmäinen luokka sisälsi oligosakkarideja, jotka eivät vaatineet enempää hajottamista ja fraktiointia. Esimerkkejä tästä luokasta ovat maltoosi, raffiinoosi ja stakyoosi. Toinen luokka muodostui oligosakkarideista, jotka oli saatu luonnossa esiintyvistä polysakkarideista, jotka hajotettiin osaksi entsyymaattisesti tai kemiallisesti ja fraktioitiin koon mukaan. Esimerkkejä tästä luokasta ovat amyloosista, kondroitiinista ja dekstraanista johdetut oligosakkaridit ja *Pichia holstii*-hiivasta peräisin oleva mannopentoosifosfaatti.

Maltoosi, raffiinoosi ja stakyoosi ostettiin Sigma Chemical Co:lta, St Louis, MO. Maltotriooosi, maltotetroosi, maltopentoosi, maltoheksoosi ja maltoheptoosi saatiin Seikagakulta, Tokio, Japani, ja ne edustavat oligosakkarideja, jotka on puhdistettu α -1,4-sidotun glukoosihomopolymeerin, amyloosin, rajoitetuista amylaasidigesteistä. Kondroitiinitetra-, -heksa- ja -oktasakkaridit puhdistettiin geelisuodatusfraktioinnilla kondroitiini-6-sulfaatin naudankiveshyaluronidaasidigestistä aikaisemmin kuvatulla tavalla (32). Sykloheksa-, -hepta- ja -okta-amylaasit saatiin Sigmalta. Nämä oligosakkaridit voidaan sulfatoida esimerkissä 5 kuvatulla tavalla.

Esimerkiksi maltoheksoosisulfaatti valmistettiin seuraavasti. Liuokseen, jossa oli rikkitrioksidi-pyridiinikompleksia (4,0 g) (Alrdich) vastatilatusta DMF:ssä (5 ml) 80°C:ssa, lisättiin tiputtamalla maltoheksoosin (0,5 g) liuos kuivassa pyridiinissä

(15 ml), ja tätä seosta kuumennettiin 80°C:ssa vielä 90 minuuttia. Supernatantti dekantoiitiin vielä lämpimänä, ja tahmea jäännös pestiin perusteellisesti metanolilla (10 ml) kolme kertaa. Kun jäännösmetanoli oli dekantoitu, tuote liuotettiin veteen (15 ml) ja neutraloitiin (pH ~6:een) bariumasetaatilla (noin 2,0 g 10 ml:ssa vettä) 5 voimakkaasti sekoittaen. Sentrifugoinnin (3 000 x g) jälkeen päällä oleva liuos dekantoiitiin ja otettiin talteen, ja saostunut bariumsulfaattipelletti pestiin perusteellisesti vedellä (3 x 10 ml). Talteenotettu pintaliuos ja pesuvedet yhdistettiin ja pantiin DOWEX 50W-X8-400 kationinvaihtohartsikolooniin (H⁺-muoto) (2,5 x 14 cm). Kolonnia eluoiitiin vedellä, kunnes eluaatti oli neutraali. Eluaattia (~250 ml) sekoi- 10 tettiin ja neutraloitiin (pH ~7:ään) natriumasetaatilla (3,5 g). Liuos laimennettiin asetonilla (1 litra) ja sentrifugoitiin (1 750 x g) tuotteen erottamiseksi. Pelletti hienonnettiin jauhemaiseksi murskaamalla metanolin alla ja sitten sitä sekoitettiin vielä metanolin alla ja suodatettiin sitten pois. Suodos pestiin useita kertoja metanolilla puhtaan (ei epäorgaanisia suoloja) yhdisteen (0,88 g; 55 %) saamiseksi. Tuote ei 15 ollut kontaminoitunut bariumionilla (mikroanalyysillä ja liekki-ionisaatiolla määritettynä) eikä typellä (mikroanalyysi).

Tässä tuotteessa todettiin 14 mahdollisesta 20 positiosta sulfatoituneiksi. Todettiin C 13,9; H 2,2; S 14,3; Na 6,7. C₃₆H₇₁O₇₃S₁₄Na₉. 45 H₂O edellyttää C 13,8; H 5,1; S 14,3; Na 6,6 %. Typpi- ja bariumarvot olivat 0,32 ja 0 % todetut, vastaavassa jär- 20 jestyksessä, ja odotetut arvot olivat 0 % kummastakin.

¹H NMR-tulokset (300 MHz - Gemini 300; vertailuaineena asetoni 2,25 ppm alakenttään TMS:stä) osoittivat edellä mainitusta maltoheksososisulfaatista, että 14 mahdollisesta 20 positiosta oli sulfatoituneita. Tämä määritettiin 4,15 ppm:n paikkeille keskittyneiden vetyjen kemiallisista siirtymistä (integrointi 20 H) versus 4,4 ppm:n paikkeille keskittyneet (integrointi 16 H). Voidaan olettaa, että kaikki 25 primaariset OH-ryhmät, t.s. positiossa 6 olevat, sulfatoituvat, koska tämä on viimeinen steerisesti estynyt positio. Edelleen voidaan olettaa, että sisäisissä sokeritähteissä vain yksi muu positio sulfatoituu. Terminaalisissa sokeritähteissä, positiossa 6 olevan lisäksi, kaksi muuta positiota sulfatoituu.

30 Mannopentoosifosfaatti valmistettiin eksopolysakkaridista, joka oli tuotettu diploidihivasta *Pichia holstii* (kanta NRRL Y-2448, aikaisemmin *Hansenula holstii*). *P. holstii* kasvatusmenetelmä ja mannopentoosifosfaatin eristämismenetelmä perustui aikaisemmin kuvattuun (33, 34). Lyhyesti raaka eksopolysakkaridi eristettiin aerobisesti kasvatetun hiivaviljelmän supernatanteista kaliumsuolana etanolisaostuksella. Sitten käytettiin happohydrolyysiä mannopentoosifosfaatin vapauttamiseksi 35 eksopolysakkaridin fosfomannaanimonoesteriytimeksi (PPME). PPME ja manno-

pentoosifosfaatti erotettiin sitten toisistaan bariumsuoloina differentiaalisella etanolisaostuksella ja sen jälkeen geelisuodatuksella. Oligosakkaridilla on rakenne P-6-Man- α -(1 \rightarrow 3)-Man- α -(1 \rightarrow 3)-Man- α -(1 \rightarrow 3)-Man- α -(1 \rightarrow 2) Man (34).

5 Hiivaeksopolysakkaridista eristetty hiivamannopentoosifosfaatti (33, 34) valmistettiin seuraavalla tavalla. Hiivamannopentoosifosfaatin (0,09 g) suspensio DMF:ssä (2 ml) ja pyridiiniä (3 ml) lisättiin liuokseen, jossa oli rikkiatrioksidi-pyridiini-

10 kompleksia (0,8 g) (Aldrich) DMF:ssä (1 ml). Seosta kuumennettiin 80°C:ssa 2 tuntia. Supernatantti dekantoiitiin vielä lämpimänä ja tahmea jäännös pestiin perusteellisesti metanolilla (2 ml) kolme kertaa. Jäännösmetanolin dekantoinnin jälkeen tuote

15 liuotettiin veteen (5 ml) ja neutralisoitiin (pH 6:een) bariumasetaatilla (noin 0,7 g 5 ml:ssa vettä) voimakkaasti sekoittaen. Sentrifugoinnin jälkeen (3 000 x g) pinnalla oleva neste dekantoiitiin ja saostunut bariumsulfaattipelletti pestiin perusteellisesti vedellä (3 x 10 ml). Pinnalla oleva neste ja pesunesteet yhdistettiin ja pantiin DO-

20 WEX 50W-X8-400 kationinvaihtohartsikolonniin (H⁺-muoto) (2,5 x 14 cm). Kolonnia eluoiitiin vedellä, kunnes eluaatti oli neutraali. Eluaattia (noin 50 ml) sekoitettiin ja neutraloitiin (pH 7:ään) natriumasetaatilla (noin 0,4 g). Liuos laimennettiin asetonilla (150 ml) ja sentrifugoitiin (1 750 x g) tuotteen erottamiseksi. Pelletti hienonnettiin jauhemaiseksi murskaamalla metanolin alla ja sitten sitä sekoitettiin vielä metanolin alla ja suodatettiin sitten pois. Kiinteä aine pestiin useita kertoja metano-

25 lilla, jolloin saatiin sulfatoitu hiivamannopentoosifosfaatti (0,18 g). Tuote ei ollut kontaminoitunut bariumionilla (mikroanalyysillä ja liekki-ionisaatiolla määritettynä) eikä tyvellä (mikroanalyysi).

Tässä tuotteessa todettiin 10 mahdollisesta 16 positiosta sulfatoituneiksi. Todettiin C 15,35; H 2,7; P 1,2; S 13,7; Na 8,5. C₃₀H₄₁O₅₉PS₁₀Na₉. 25 H₂O edellyttää C 15,3; H 3,5; P 1,3; S 13,6; Na 8,8 %. Typpi- ja bariumarvot olivat 0,16 ja 0 % todetut, vastaavassa järjestyksessä, ja 0 % odotettu kummastakin.

1,6- α -Glukoosioligosakkaridit valmistettiin happohydrolysoimalla dekstraania (keskimääräinen MW 71 000; Sigma Chemical Co.). Niinpä dekstraania (5 g) liuotettiin tislattuun veteen (100 ml) ja tämä liuos säädettiin pH 1,8:aan 1M kloorivetyhapolla.

30 Seosta refluksotiin (100°C) 48 tuntia. Seos kuivattiin alipaineella ja täydennettiin 100 ml:ksi tislatulla vedellä ja kuivattiin toiseen kertaan alipaineessa. Absoluuttista etanolia (100 ml) lisättiin jäännökseen ja se haihdutettiin pois alipaineessa. Jäännös täydennettiin 4 ml:ksi tislatulla vedellä ja pantiin vesivaipalla varustettuun 5 x 90

35 cm:n kromatografiakolonniin, joka oli pakattu hienolaatuisella P2-kokoekskluusiogeelillä (BioRad). Kolonni oli pakattu, esikuumennettu ja sitä oli ajettu 60°C:ssa kaksi päivää ennen käyttöä. Kun kolonniin oli lisätty 1,6- α -glukoosi-

oligosakkaridiseos, sen lämpötila pidettiin 60°C:ssa ja eluoiitiin vedellä (1 ml/min). Kolonnista eluoituvat tuotteet identifioitiin piikkeinä differentiaalirefraktometrialla ja fraktiot otettiin talteen sen mukaisesti. Tällä tavalla koottiin fraktioita, jotka vastasivat erillisten piikkien alla olevia alueita. Jokainen fraktio kromatografoitiin uudelleen samanlaisessa P2-geelikolonnissa 60°C:ssa ja eluoiitiin vedellä virtausnopeudella 0,5 ml/min. Niinpä esimerkiksi fraktio, joka identifioitiin 1,6- α -glukoheksosiksi (0,19 g) kromatografoitiin uudelleen, jolloin saatiin tärkein keskipiikki olka kammallakin puolella. Keskipiikissä eluoituva tuote eristettiin poistamalla vettä alipaineessa, jolloin saatiin (0,16 g) ainetta, joka kromatografoitiin uudelleen samanlaisessa P2-geelikolonnissa 60°C:ssa virtausnopeudella 0,3 ml/min. Tällä tavalla saatiin glukoheksosia (0,14 g) (sähkösumutus- $M^+=990$). Samalla tavoin eristettiin 1,6- α -glukotriooisi, 1,6- α -glukotetroosi (0,21 g) ja 1,6- α -glukopentoosi (0,17 g).

Esimerkki 7

A. Materiaalit ja menetelmät

15 Sulfatoitujen oligosakkaridien koagulaatiota estävä vaikutus

Jokaisen sulfatoidun oligosakkaridin koagulaatiota estävä vaikutus määritettiin aikaisemmin kuvatulla tavalla (35) käyttämällä sekä trombiiniaika- että aktivoitu osittainen tromboplastiiniaika -menettelyä. Kunkin valmisteen aktiivisuutta verrattiin hepariiniverrokkiin ja koagulaatiota estävä aktiivisuus ilmoitettiin prosentteina hepariinin aktiivisuudesta.

Ihmisen angiogeneesikoe

Käytettyä menetelmää kuvataan kansainvälisessä patenttihakemuksessa nro PCT/AU95/00105, jonka sisältö sisällytetään tähän viitejulkaisuna. Verisuonia, läpimitaltaan noin 1 - 2 mm ja pituudeltaan 2 - 5 cm, leikattiin ihmisen istukasta 6 tunnin kuluessa syntymästä. Verisuonet sijoitettiin Hankin BBS:ään, joka sisälsi fungitsonia 2,5 mg/ml, ja leikattiin 1 - 2 mm pituisiksi fragmenteiksi käyttämällä ohuita leikkelypihtejä ja iridektomiasaksia. Verisuonikappaleet puhdistettiin jäännöshyytymistä ja liotettiin Hankin BSS:ssä ennen käyttöä. Verisuonien leikkaaminen ja jakaminen suoritettiin suurennuslampun avulla (Maggylamp, Newbound, Balmain, NSW, Australia). Samanlaisia angiogeenisiä vasteita saatiin laskimoista ja valtimoista peräisin olevista verisuonista, mutta kussakin kokeessa käytettiin vain yhdestä verisuonesta peräisin olevaa suonenkappaletta.

Angiogeneesikokeet suoritettiin 24 ja 48 -kuoppaisilla viljelylevyillä (Costar, Cambridge, MA). 24-kuopan formaatissa 30 μ l naudan trombiinia (50 NIH yksikköä/ml 0,15 M NaCl; Sigma Chemical Co., St Louis, MO) lisättiin jokaiseen kuoppaan ja sen jälkeen 1,0 ml/kuoppa 3 mg/ml naudan fibrinogeeniä (Sigma) Medium 199:ssä.

5 Trombiini ja fibrinogeeni sekoitettiin nopeasti ja yksi verisuonenkappale sijoitettiin nopeasti kuopan keskelle ennen hyytymän muodostumista. Tavallisesti fibrinigeelin muodostumista tapahtui 30 sekunnissa ja verisuonenkappaleen annettiin jäädä suspendoituneeksi geeliin. Geelin muodostumisen jälkeen lisättiin 1,0 ml/kuoppa Medium 199:ä, johon oli lisätty 20-prosenttista vasikan sikiön seerumia (FCS), 0,2 mg

10 ϵ -aminokapronihappoa, L-glutamiinia ja antibiootteja (gentamysiiniä ja fungatso-nia). 48 kuopan formaatissa kaikki reagenssit puolitettiin. Verisuonia kasvatettiin 37°C:ssa kostutetussa ympäristössä 14 - 21 vuorokautta, jona aikana kasvatusliuos vaihdettiin kahdesti päivässä. Verisuonien uudiskasvu määritettiin tietokoneperus-taisella kuva-analyysillä käyttämällä NIH Image -ohjelmaa viljelmistä otetuista digi-taalikuvista, jotka otettiin Dycam-digitaalikameralla, joka oli asennettu käänteismik-roσκοoppiin (Olympus, Tokio, Japani).

Heparanaasikoe

Heparanaasikoe perustuu siihen havaintoon, että seerumin proteiini, runsaasti his-tidiiniä sisältävä glykoproteiini (HRG), sitoutuu heparaanisulfaattiketjuihin ja peit-tää heparanaasin pilkkoutumiskohdan. Sen havainnon perusteella, että heparanaasil-la pilkottu heparaanisulfaatti ei pysty sitoutumaan HRG:hen, on kehitetty hepara-naasikoe, jossa ^3H -leimattuja heparaanisulfaattiketjuja hajotetaan heparanaasilla, hajotettu heparaanisulfaatti sidotaan HRG:hen kytkettyihin helmiin ja mitataan si-toutumaton ^3H -leima. Substraatin digestion edetessä kasvava määrä ^3H -leimaa ei

20 pysty sitoutumaan HRG-helmiin. Tämä menetelmä onkin yksinkertainen ja nopea tapa mitata heparanaasiaktiivisuutta kudosekstrakteissa ja määrittää eri yhdisteiden kykyä estää heparanaasia.

Aluksi naudan suolen heparaanisulfaatti (Mr av 32 kD) de-N-asetyloitiin osittain kuumentamalla hydratsiinihydraatissa (36) ja asetiloitiin uudelleen ^3H -etikka-happoanhydridillä. Kanan HRG, joka oli puhdistettu Rylattin *et al.* (1981) (37) me-netelmällä, kytkettiin CNBr:lla aktivoituun Sepharose 4B:hen (Pharmacia) valmis-tajien ohjeiden mukaisesti.

Ihmisen verihiutaleiden heparanaasiaktiivisuus määritettiin inkuboimalla (37°C, 30 min) puhdistettua ihmisen verihiutaleheparanaasia (jolla on osoitettu olevan sa-ma aktiivisuus heparaanisulfaatin suhteen kuin heparanaasilla, jota on läsnä erittäin

35

metastaattisissa viljellyissä ihmisen karsinoma HCT 116, rotan adenokarsinoma 13762 MAT ja hiiren melanooma B16 -solulinjoissa) 60 pmoolin kanssa ^3H -radioleimattua naudan suolen heparaanisulfaattia. Aktiivisuus määritettiin nopeudella, jolla syntyi pienehköjä (noin 5 kD) heparaanisulfaattifragmentteja, jotka eivät sitou-
 5 tuneet, minkä jälkeen inkubointiseos (100 μl) ajettiin HRG-Sepharose minikolonni-
 en läpi (200 μl pakattuja helmiä), jotka pidättivät suuremman pilkkoutumattoman ja
 osaksi pilkotun substraatin.

Heparanaasin estokokeissa entsyymiin lisättiin ennen radioleimatun substraatin li-
 10 säämistä eri pitoisuuksia inhibiittoria, joka säilyi reaktioseoksessa koko inkuboinnin
 ajan.

Metastaasikoe

Eri sulfatoitujen oligosakkaridien metastaaseja estävä aktiivisuus määritettiin käyt-
 tämällä erittäin metastaattista rotan matorauhasadenokarsinoma 13762 MAT
 -solulinjaa (35). Kasvainsoluja pidettiin *in vitro* aikaisemmin kuvatulla tavalla (35).
 15 Naaraspuolisiin Fisher 344 -rottiin (10 - 13 viikon ikäisiin) ruiskutettiin i.v. 2×10^5
 13762 MAT -soluja 0,6 ml:ssa RPMI 1640 -liuosta, joka sisälsi 10 % FCS:ä. Sama-
 aan aikaan kun eläimiin ruiskutettiin kasvainsoluja, niihin ruiskutettiin myös 2 mg
 sulfatoitua oligosakkaridia, jolloin samanlaisia tuloksia saatiin riippumatta siitä,
 ruiskutettiinkö oligosakkaridi i.v., i.p. vai ihon alle. Rotilta poistettiin keuhkot 13
 20 vuorokautta kasvainsoluruiskeen jälkeen, ne sijoitettiin Bouinin liuokseen vähintään
 24 tunniksi ja keuhkometastaasit määritettiin sitten leikkausmikroskoopin alla.
 Keuhkometastaasien lukumäärää sulfatoidulla oligosakkaridilla käsitellyissä rotissa
 verrattiin vertailueläimiin, kunkin ryhmän käsittäessä vähintään neljä eläintä.

25 Sulfatoitujen oligosakkaridien vaikutus FGF-hepariini/heparaanisulfaatti- interaktioon

Sitomiskoetta, jota on kuvattu muualla (38), käytettiin mittaamaan aFGF:n ja
 bFGF:n sitoutumista hepariiniin ja määrittämään eri sulfatoitujen oligosakkaridien
 kykyä estää tämä interaktio. Lyhyesti FGF:t immobilisoitiin 96-kuoppaisten PVC-
 levyjen kuoppiin ja radioleimatun hepariinin sitoutuminen immobilisoituihin
 30 FGF:iin määritettiin. Estokokeissa tutkittiin sulfatoitujen oligosakkaridien sarjalai-
 mennoksia tarkoituksena selvittää niiden kyky estää FGF-hepariini-interaktiota. Es-
 totulokset ilmoitettiin sulfatoitujen oligosakkaridien konsentraationa, joka tarvitaan
 estämään hepariinia sitoutumasta immobilisoituihin FGF:iin 20-prosenttisesti tai 50-

prosenttisesti. Leimaamaton hepariini oli kokeessa mukana verrokkina kaikissa sitoutumisenestokokeissa.

5 FGF-heparaanisulfaatti-interaktio määritettiin, kuten aikaisemmin on raportoitu (39), mittaamalla BALB/c 3T3 -fibroblastien sitoutuminen PVC:hen immobilisoi-
tuihin FGF:iin, ja solujen sitoutuminen osoitettiin värjäämällä tarttuvat solut ben-
gaalinpunaisella. Kokeessa tutkittiin sulfatoitujen oligosakkaridien kyky estää tämä
solujen adheesioprosessi, joka on täysin riippuvainen heparaanisulfaattirakenteista
BALB/c 3T3 -solujen pinnalla (39). Tulokset ilmoitettiin sulfatoidun oligosakkari-
din pitoisuutena, joka estää solujen adheesion 50-prosenttisesti (IC50).

10 Ilmataskutulehdusmalli

Koe perustuu erääseen aikaisemmin raportoituun menetelmään (40). Hiirien selkään
muodostettiin ihonalaisia ilmataskuja ruiskuttamalla 5 ml steriiliä ilmaa paljaaksi
ajellun alueen ihon alle nukutetun rotan lapaluiden väliin päivänä 1. Päivänä 3 tas-
kuun ruiskutettiin uudelleen 2,5 ml ilmaa. Tulehdus indusoiitiin päivänä 6 ruiskut-
15 tamalla suoraan taskuun 1,0 ml tioglykokollaattia, jonka pitoisuus oli 56 mg/ml, tai
1,0 ml keittosuolaliuosta verrokkiksi. Noin 17 - 20 tunnin kuluttua tioglykollaatin
ruiskutuksesta eläimet lopetettiin taittamalla niiden niska ja taskun solusisältö otet-
tiin talteen ruiskuttamalla 2,5 ml jääkylmää PBS/5%FCS:ä. Sulfatoitujen oligosak-
karidien kyky estää tulehdusreaktio tutkittiin ruiskuttamalla niitä ihon alle (50 µl
20 PBS:ssä) eri kohtiin heti tioglykokollaatin antamisen jälkeen. Prednisolonia käytet-
tiin anti-inflammatorisena vertailulääkkeenä ja se ruiskutettiin ihon alle öljyssä an-
noksena 25 mg/kg. Kunkin taskun solusisältö määritettiin käyttäen Coulter Counte-
ria ja eri leukosyyttialopopulaatiot määritettiin immunofluoresenssivirtausytomet-
rialla.

25 Hiiren astmamalli

Erästä aikaisemmin raportoitua (41) hiiren astmamallia käytettiin sulfatoitujen oli-
gosakkaridien kyvyn tutkimiseen estää aeroallergiinilla (ovalbumiinilla, OVA) in-
20 dusoitua eosinofiilien infiltroitumista keuhkoihin. Hiiriä (C57BL/6, 6 -10 viikon
ikäisiä) altistettiin i.v. ruiskeella, jolla annettiin 50 mg OVA/1 mg Alhydrogeliä
30 (CSL Ltd, Parkville, Australia) 0,9-prosenttisessä steriilissä keittosuolaliuoksessa
päivinä 0 ja 12. Päivänä 24 hiiret altistettiin OVA-aerosolille (10 mg/ml) 0,9-pro-
senttisessä keittosuolaliuoksessa 30 minuutin ajan kolme kertaa (1 tunnin välein) ja
sitten ne altistettiin samalla tavalla päivinä 26 ja 28. Aerosoli kehitettiin nopeudella
6 litraa/min sumuttimella, joka tuotti pisaroita, joiden keskiläpimitta oli 39 µm, sul-

jettuun 800 cm³:n tilaan. Päivänä 29 hiiret lopetettiin taittamalla niiden niska. Henkitorvet kanyloitiin ja keuhko-ontelot pestiin 4 x 1 ml:lla 0,09-prosenttista keittosuolaliuosta, joka sisälsi BSA:ta (0,1 % w/v) 37°C:ssa. Noin 0,8 ml sisään ruiskuttua nestettä otettiin talteen joka pesusta. Keuhkorakkuloiden pesuneste (BALF), joka saatiin yhdestä eläimestä, koottiin yhteen ja solujen lukumäärä määritettiin käyttämällä standardinmukaista hemosytometriä. BALF-soluille tehtiin myös solusentrifugointi ja ne värjättiin eri tavalla May-Grunwald-Giemsaliuoksella, ja eosinofiilit identifioitiin morfologisten kriteerien perusteella. Tulokset laskettiin eosinofiilien lukumääränä/ml BALF:ä. Sulfatoituja oligosakkarideja annettiin eläimille joko systeemisesti i.p. insertoiduilla Alzet miniosmoottisilla pumpuilla tai keuhkojen kautta aerosolina. Miniosmoottiset pumput asetettiin paikoilleen päivänä 23, 24 tuntia ennen OVA-altistusta ja lääkettä annettiin jatkuvasti, kunnes eläimet lopetettiin päivänä 29. Kun kysymyksessä oli aerosolin anto, hiiret altistettiin sulfatoitujen oligosakkaridisaerosolille 0,9-prosenttisessa keittosuolaliuoksessa 30 minuutin ajan kolme kertaa (1 tunnin välein) päivinä 23, 25 ja 27.

Kokeellinen autoimmuunienkefalomyeliittimalli (EAE)

Pernasoluja valmistettiin EAE:n adoptiivista siirtoa varten aikaisemmin kuvatulla tavalla (43). Lyhyesti Lewisin rottia altistettiin emäksiselle myeliiniproteiinille, immuunit pernasolut aktivoitiin ConA:lla *in vitro* ja 30 x 10⁶ ConA:lla aktivoitujen EAE-efektorisolujen siirrettiin i.v. kuhunkin vastaanottajaan. Miniosmoottisia pumppuja (Alzet), jotka sisälsivät sulfatoituja oligosakkarideja, asetettiin ihon alle samanaikaisesti solujen siirron kanssa ja ne jakelivat annoksen 70 mg/kg/vuorokausi 14 vuorokauden ajan. Kliininen EAE arvioitiin seuraavan kaavan mukaan: 0 oireeton; 1 hännän distaalipuoli velto; 2 koko häntä velto; 3 ataksia, vaikeuksia ojentautumisessa; 4 takaraajojen heikkoutta; ja 5 takajalkojen halvaantuminen.

Tulehduksellinen vatsatautimalli

Tulehduksellinen vatsatauti indusoitiin hiirille lisäämällä juomaveteen 5 % (w/v) dekstraaninatriumsulfaattia (DSS) sellaisena kuin TdB Consultancy, Uppsala, Ruotsi, sen toimitti. Liuoksen pH säädettiin pH 8,0:aan ja se suodatettiin 0,45 µ:n liuoskalvon läpi. DSS-liuokset koottiin päivittäin, suodatettiin uudelleen ja tilavuudet säädettiin tuoreella DSS-varastoliuoksella. Kuuden - seitsemän viikon ikäisiä koiraspuolisia BALB/c-hiiriä seuloitiin ruumiinpainon mukaan ja 20 - 23 g painavat pantiin häkkeihin 5 hiiriä/häkki.

Hiiriin ruiskutettiin sulfatoitua mannopentoosifosfaattia (20 mg/kg/vrk) tai kuljetinta (steriiliä vettä) 8 tunnin välein päivästä 0 päivään 10. Injektiotilavuus standardisoitiin 100 µl:ksi ja ruiskutettiin ihon alle niskaan.

- DSS:n kulutusnopeus, ruumiinpaino ja oireet pisteytettiin päivittäin kaikista rotista.
- 5 Ripuli- ja rektaaliverenvuoto-oireet arvioitiin joko lieviksi tai voimakkaiksi ja pisteytettiin numeroin 1 ja 4, vastaavassa järjestyksessä. Liman esiintyminen pantiin sekimerkille ja sisällytettiin lieväksi ripulioireeksi. Ripuli- ja rektaali- vuotopisteiden yhteismäärä jaettiin sitten eloonjääneiden eläinten lukumäärällä kysymyksessä olevassa ryhmässä asianomaisena päivänä. Kokonaissumma on ripuli- ja rektaali- vuotopisteiden yhteenlaskettu summa.
- 10

B. Tulokset

Sulfatoitujen luonnossa esiintyvien oligosakkaridien antioangiogeeninen ja antimetastaattinen aktiivisuus

- Kun oli syntetisoitu sarja sulfatoituja luonnossa esiintyviä oligosakkarideja, ne tutkittiin heti joukolla biologisia kokeita. Taulukkoon 1 on koottu tulokset, jotka saatiin
- 15 12 luonnossa esiintyvän oligosakkaridin sulfatoituilla muodoilla. Suramiinin (yhdisteen, jolla on kohtalainen antiangiogeeninen ja heparanaasia estävä aktiivisuus) (42) ja hepariinin biologiset vaikutukset on myös sisällytetty taulukkoon 1 vertailun vuoksi.

- 20 Aluksi osoitettiin, että kaikilla sulfatoituilla oligosakkarideilla oli mitätön antikoaguloiva aktiivisuus, ts. 2 % hepariinin aktiivisuudesta (taulukko 1). Tämä oli merkittävä ominaisuus, koska hepariinin, joka on voimakas antimetastaattinen yhdiste, kliininen käyttö on rajoitettua tähän indikaatioon johtuen sen voimakkaasta antikoaguloivasta vaikutuksesta.

- 25 Kolme sulfatoituista luonnossa esiintyvistä oligosakkarideista oli varsin voimakkaita ihmisen angiogeneesin estäjiä, nimittäin sulfatoitu mannopentoosifosfaatti (*P. holstiista* johdettu), maltotetroosisulfaatti ja maltoheksosisulfaatti. Mannopentoosifosfaatti ja maltoheksososi olivat voimakkaimmat näistä yhdisteistä, niiden 50-prosenttisesti estävä pitoisuus oli 2 µg/ml, kun taas maltotetroosin 50-prosenttisesti estävä pitoisuus oli 20 µg/ml. Esimerkki korostuneesta angiogeneesin estosta, joka saatiin 20 µg:lla maltoheksosisulfaattia per ml, on esitetty kuviossa 1. On mielenkiintoista havaita, että hepariinilla on vähän antiangiogeenistä vaikutusta. Näyttääkin todennäköiseltä tämän tyyppiseen aktiivisuuteen tarvitaan suhteellisen lyhytketjuisia sulfatoituja oligosakkarideja. Täydellisempi titraus maltoosisarjan angioge-
- 30

neesin estosta on esitetty kuviossa 2 ja maltoheksoosisulfaatilla saadut tulokset on esitetty kuviossa 3. Voidaan havaita, että maltoosisarjasta maltoosisulfaatilla oli vähän estovaikutusta, kun sen sijaan maltotetroosi- ja maltoheksoosisulfaatit olivat varsin voimakkaita estäjiä (kuvio 2).

- 5 Kaikissa taulukossa 1 esitetyissä angiogeneesikokeissa oligosakkaridi lisättiin kasvatusliuokseen angiogeneesikokeen alussa. Esitutkimukset (tuloksia ei esitetty) osoittavat kuitenkin, että maltoheksoosisulfaatin lisääminen angiogeneesivasteen alkamisen jälkeen pystyy myös estämään verisuonia kasvamasta edelleen, vaikkakin tehokain esto saadaan, kun yhdiste lisätään viljelyn alussa.
- 10 Sulfatoidut oligosakkaridit erosivat myös merkittävästi toisistaan heparanaasin estovaikutuksiltaan, voimakkaimpien estäjien ollessa sulfatoitu mannopentoosifosfaatti ja maltoheksoosisulfaatit, näiden kahden yhdisteen aktiivisuuden muistuttaessa hepariinin aktiivisuutta (taulukko 1). Mielenkiintoista on, että nämä kaksi yhdistettä ovat myös tehokkaita angiogeneesiä estäviä yhdisteitä. Angiogeneesin esto ei kuitenkaan korreloinut monien yhdisteiden heparanaasinestoaktiivisuuden kanssa.
- 15 Esimerkiksi sulfatoidut sykloamyloosit olivat varsin voimakkaita heparanaasin estäjiä, mutta huonoja angiogeneesin estäjiä. Maltoosisarja oli myös hyvin informatiivinen ketjunpituuden ja heparanaasin eston kannalta. Taulukossa 3 esitetään heparanaasinestoaktiivisuus koko maltoosisarjasta, disakkaridista (maltoosi) heptasakkaridiin (maltoheptoosi). Maltoosi oli ei-estävä, maltotrioosi oli heikosti estävä, maltotetroosin estoaktiivisuus oli kohtalainen, kun taas penta-, heksa- ja heptasakkaridien estoaktiivisuus oli voimakas. Optimaaliseen heparanaasineston tarvitaan siis sulfatoitu pentasakkaridi tai korkeampi sakkaridi.
- 20
- Monien sulfatoitujen sokerien metastaaseja estävä aktiivisuus on testattu myös *in vivo* (taulukko 1). Heparanaasineston ja antimetastaattisen aktiivisuuden välillä on yleensä kohtuullisen hyvä korrelaatio. Niinpä sulfatoidulla mannopentoosifosfaatilla ja maltoheksoosisulfaatilla, kahdella yhdisteellä, joilla on voimakkain heparanaasia estävä vaikutus, on voimakkain antimetastaattinen aktiivisuus, itse asiassa niiden kyky estää metastaaseja ei merkittävästi eroa hepariiniin aktiivisuudesta (taulukko
- 25
- 1). Kaksi muuta yhdistettä, syklo-okta-amyloosisulfaatit ja stakyoosisulfaatit olivat myös kohtalaisen tehokkaita antimetastaatteja, joka ominaisuus on yhdenmukainen niiden vaatimattoman heparanaasinestovaikutuksen kanssa. Kaiken kaikkiaan nämä tulokset johtavat ajattelemaan, että sulfatoidulla mannopentoosifosfaatilla ja maltoheksoosisulfaatilla on samanaikaisesti huomattava antiangiogeeninen, antimetastaattinen ja heparanaasia estävä vaikutus.
- 30
- 35

Sulfatoitujen oligosakkaridien maltoosisarjan metastaaseja ehkäisevä vaikutus on esitetty yksityiskohtaisemmin kuviossa 4. Ketjunpituuden kasvaessa todettiin tasainen nousu oligosakkaridien antimetastaattisessa aktiivisuudessa, penta-, heksa- ja heptasakkaridien ollessa aktiivisimpia. Kun maltoosisulfaattia annettiin laskimonsäisesti annoksena 2 mg/rotta, sillä ei ollut mitään vaikutusta metastaaseihin (kuvio 5 4A), mutta kun sitä annettiin ihon alle annoksena 4 mg/rotta, todettiin merkittävä metastaasien esto (kuvio 4B). Myöhemmät kokeet paljastivat, että injektiovasta (ts. i.v., s.c. tai i.p.) riippumatta sulfatoiduilla oligosakkarideilla oli vertailukelpoinen antimetastaattinen aktiivisuus (tuloksia ei esitetty). Itse asiassa maltoosisulfaatin antimetastaattinen aktiivisuus todettiin vasta, kun eläimille annettiin suuria annoksia. Koska maltoosisulfaatti on kovin heikko heparanaasin estäjä, tämä tulos johtaa ajattelemaan, että heparanaasin esto ei ehkä olekaan ainoa tapa, jolla sulfatoidut oligosakkaridit estävät kasvainten metastaaseja, erityisesti silloin, kun oligosakkarideja käytetään suurina annoksina.

15 Sykloamylooseja sulfatoitiin ja ne sisällytettiin tutkimukseen, koska ne edustavat ei-lineaarisia oligosakkarideja. On mielenkiintoista havaita, että näiden yhdisteiden aktiivisuus oli vain vaatimatonta (taulukko 1), mikä viittaa siihen, että optimiaktiivisuuteen tarvitaan ehkä lineaarisia oligosakkarideja. Lisäksi aktiivisimmat sulfatoidut oligosakkaridit olivat paljon tehokkaampia angiogeneesin, metastaasien ja heparanaasin estäjiä kuin suramiini (taulukko 1), lääkeaine, jonka kliiniset kokeet antiangiogeenisenä yhdisteenä ovat käynnissä (42).

20 Koska yhdisteiden antiangiogeeninen aktiivisuus ei aina suoraan korreloinut niiden heparanaasinestoaktiivisuuden kanssa, näyttäisi todennäköiseltä, että sulfatoidut oligosakkaridit voisivat estää angiogeneesiä jollakin toisella mekanismilla. Kuten edellä mainittiin, on erittäin todennäköistä, että eräät sulfatoidut oligosakkaridit voivat häiritä angiogeenisten kasvutekijöiden toimintaa katkaisemalla kasvutekijän ja heparaanisulfaatin interaktiot. Aikaisemmat tutkimukset (katso kansainvälinen patenttihakemus nro PCT/AU95/00105) ovat osoittaneet, että tässä esimerkissä käytetty ihmisen angiogeeniesikoe on paljolti riippuvainen endogeenisestä bFGF:stä ja vähemmän riippuvainen aFGF:n ja VEGF:n toiminnasta. Niinpä tutkittiin eri sulfatoitujen oligosakkaridien kykyä toimia kilpailijoina bFGF:n, aFGF:n ja VEGF:n ja hepariinin tai hepariinisulfaatin interaktiossa.

30 Todettiin, että ketjunpituuden kasvaessa sulfatoitujen oligosakkaridien maltoosisarjasta tuli tehokkaampia bFGF:n ja aFGF:n ja solun pinnan heparaanisulfaattien interaktion estäjiä (taulukko 2), ts. maltoosi oli heikosti estävä, kun taas penta-, heksa- ja heptasakkaridit olivat aktiivisimpia. Sulfatoidulla mannopentoosifosfaatilla oli myös

huomattava estoaktiivisuus tässä systeemissä (taulukko 2). Kuviossa 5 on esitetty sulfatoitujen oligosakkaridien maltoosisarjan aFGF-heparaanisulfaatti-interaktion estoa kuvaavat täydelliset käyrät. Lisätutkimukset osoittivat, että maltoheksoosisulfaatti esti myös voimakkaasti radioleimatun hepariinin sitoutumista bFGF:ään ja aFGF:ään (tuloksia ei esitetty).

Koska maltoheksoosisulfaatti oli eräs aktiivisimpia antiangiogeenisiä ja antimetastaattisia yhdisteitä, tutkittiin sulfatointiasteen vaikutusta sen biologiseen aktiivisuuteen jonkin verran yksityiskohtaisemmin. Aluksi havaittiin, että vaikka voimakaimmin sulfatoidussa maltoheksoosissa todettiin jonkin verran antikoaguloivaa aktiivisuutta, tämä aktiivisuus oli kuitenkin erittäin heikkoa verrattuna hepariiniin (taulukko 2). Sulfatoitumisen lisääntyessä maltoheksoosin kyky estää heparanaasin aktiivisuutta ja FGF:n sitoutumista heparaanisulfaattiin kasvoi kuitenkin tasaisesti (taulukko 2). Estoaktiivisuus tasoittui kuitenkin molemmissa systeemeissä, kun sulfatointiaste oli 85 % tai korkeampi.

Metastaasien estotutkimukset (kuvio 6) osoittivat myös, että sulfatoitumisasteen noustessa maltoheksoosisulfaatista tuli tehokkaampi metastaaseja estävä lääke. Sitä vastoin oli olemassa viite siihen suuntaan, että erittäin voimakkaasti sulfatoitu maltoheksoosi (90 - 100 -prosenttisesti sulfatoitu) olisi tehottomampi angiogeneesin estäjä (kuvio 7). Nämä tulokset johtavat ajattelemaan, että angiogeneesin ja metastaasien estäminen edellyttää hienovaraisia eroavuuksia sulfatoidussa oligosakkaridirakenteessa. Joka tapauksessa on identifioitu joukko luonnossa esiintyvistä oligosakkarideista johdettuja sulfatoituja oligosakkarideja, joilla on samanaikaisesti sekä voimakas antimetastaattinen että antiangiogeeninen aktiivisuus. Nämä yhdisteet ovat *P.holstiista* johdettu sulfatoitu mannopentoosifosfaatti ja maltopentoosi-, maltoheksoosi- ja maltoheptoosisulfaatti.

Sulfatoitujen synteettisten oligosakkaridien antiangiogeeninen ja antimetastaattinen aktiivisuus

Esimerkeissä 1 - 5 kuvatuista sulfatoiduista synteettisistä oligosakkarideista tutkittiin myös niiden biologinen aktiivisuus. Taulukkoon 3 on koottu mannoosia, galaktoosia tai glukoosia sisältävien sulfatoitujen synteettisten oligosakkaridien kyky estää koaguloitumista, heparanaasin toimintaa ja kasvutekijöiden ja heparaanisulfaatin välistä sitoutumista. Kaikilla testatuilla synteettisillä sulfatoiduilla oligosakkarideilla oli merkityksetön koagulaatiota estävä vaikutus. Mannoosi- ja glukoositrisakkarideja lukuunottamatta kaikki muut sulfatoidut oligosakkaridit olivat kuitenkin kohtuullisen tehokkaita heparanaasiaktiivisuuden ja kasvutekijä-heparanaasisitoutumisen estä-

jiä. Itse asiassa kokonaispäätelmä on, että sulfatoidut synteettiset oligosakkaridit, jotka sisältävät 4 - 6 heksoosiyksikköä (s.o. D-mannoosia, D-galaktoosia tai D-glukoosia), ovat erittäin aktiivisia näissä kokeissa. Poikkeus on galaktotriosisulfaatti, joka oli jokseenkin yhtä aktiivinen kuin muut galaktoosisarjan jäsenet.

- 5 Ihmisen angiogeneesikokeessa sulfatoidut mannoosioligosakkaridit olivat estäviä, vaikka penta- ja heksasakkaridit olivat aktiivisempia kuin tetrasakkaridi (kuvio 8) muistuttaen tehokkuudeltaan sulfatoitua mannopentoosisulfaattia. Samoin sulfatoidut mannoositetra-, mannoosipenta- ja mannoosiheksasakkaridit olivat yhtä tehokkaita kuin sulfatoitu mannopentoosisulfaatti metastaaseja estävänä lääkkeenä (kuvio 9).
- 10 9). Galaktoosia sisältävät sulfatoidut oligosakkaridit ja glukohexsoosisulfaatti estivät myös metastaaseja (kuvio 10), vaikka niillä olikin lievä taipumus vähäisempään aktiivisuuteen kuin mannoosia sisältävillä yhdisteillä.

Sulfatoitujen oligosakkaridien tulehduksen vastainen aktiivisuus

- Kuten edellä mainittiin, tärkein este leukosyyttien pääsemiselle tulehduskohtiin on endoteelinalainen tyvikalvo. Tämän kalvon läpäistäkseen leukosyyteillä täytyy olla hajottavien entsyymien patteri (11). Erityisen merkityksellinen on endoglykosidaasi, heparanaasi, joka pilkkoo tyvikalvoon liittyviä heparaanisulfaattiketjuja ja on olennaisen tärkeä leukosyyttien purkautumiselle (12, 13). Itse asiassa, samoin kuin metastaasien estotutkimuksessa (35) sulfatoidut polysakkaridit, jotka estävät heparanaasiaktiivisuutta, ovat voimakkaita tulehduksen estäjiä (43, 44). Näiden havaintojen perusteella alan ammattilainen odottaisi, että sulfatoidut oligosakkaridit, jotka olivat tehokkaita antiangiogeenisiä ja antimetastaattisia aineita, olisivat hyvin tehokkaita tulehduksenestoyhdisteitä. Erityisen tärkeitä tässä suhteessa ovat maltoheksoosisulfaatti ja mannopentoosisulfaatti. Lisäksi koska angiogeneesi liittyy kroonisiin tulehdussairauksiin, kuten nivelreumaan (18), näiden yhdisteiden angiogeneesiä estävä aktiivisuus tekisi ne entistä arvokkaammiksi tulehduksen hoidossa.
- 15
- 20
- 25

- Tätä ennakkoajatusta vahvistavaa näyttöä saatiin useissa tulehduksen eläinmalleissa. Ensiksikin maltoheksoosisulfaatti, mannopentoosisulfaatti ja sulfatoitu mannopentoosisulfaatti pystyivät merkittävästi estämään tioglykollaattilla indusoitua ilmataskutulehdusta (taulukko 4). Itse asiassa eräässä kokeessa yksi ainoa ruiske mannopentoosisulfaattia oli yhtä tehokas estämään leukosyyttien infiltroitumista kuin prednisoni, joka oli hallitsevasti neutrofiilinen, kun taas maltoheksoosisulfaatti oli jonkin verran tehottomampi. Vielä suurempi tulehdusvasteen esto todettiin, kun sulfatoituja oligosakkarideja ruiskutettiin kahtena samanlaisena annoksena 6 tunnin välein.
- 30

- Toiseksi testattiin sulfatoitujen oligosakkaridien kykyä estää kroonisen astman hiirimallia. Tälle mallille on tunnusomaista eosinofiilien massiivinen tunkeutuminen keuhkoihin hiiressä, joka on altistettu aeroallergeenille (41). Sellainen tulehdusvaste on luonteenomaista krooniselle astmalle ihmisissä. Kun maltoheksosisulfaattia ja mannopentoosisulfaattia annettiin miniosmoottisten pumppujen kautta, ne estivät merkittävästi eosinofiilien kasaantumista hiiren keuhkoihin (taulukko 5). Maltoheksosisulfaatilla oli myös jonkin verran tulehduksen vastaista aktiivisuutta, kun sitä annettiin aerosolina (40 mg/ ml liuosta).
- Kolmanneksi sekä mannopentoosisulfaatti että sulfatoitu mannopentoosifosfaatti estivät merkittävästi EAE:tä taudin rottamallissa (taulukko 6). Joissakin eläimissä, jotka käsiteltiin sulfatoiduilla oligosakkarideilla, ei kehittynyt lainkaan taudin oireita. Nämä tulokset ovat yhdenmukaisia aikaisempien tutkimusten kanssa osoittaen, että sulfatoidut polysakkaridit, jotka estävät heparanaasin vaikutusta, voivat lievittää EAE:n vakavuutta (43).
- Lopuksi tutkittiin mannopentoosifosfaatin kykyä estää tulehduksellista vatsatautia hiirimallissa. Tämä malli, joka indusoidaan dekstraanisulfaatilla juomavedessä, aiheuttaa koliitin, joka muistuttaa ulseratiivista koliittia ja vähäisemmässä määrin Chronin tautia. Todettiin, että annoksena 20 mg/kg/vuorokausi sulfatoitu mannopentoosifosfaatti aikaansai akuutin koliitin selvän lievenemisen ja esti myös taudin aiheuttaman painonmenetyksen (taulukko 7). Verrokkit saivat tässä tutkimuksessa sulfatoituja oligosakkarideja ruiskeena, mutta eivät dekstraanisulfaattia juomavedessä.

Taulukko 1
Eri luonnossa esiintyvien oligosakkaridien sulfatoitujen muotojen ihmisen angiogeneesin, heparanaasin ja metastaasien esto

Yhdiste	Sakkaridiyksikköjen lukumäärä	Antikoaguloiva aktiivisuus ^a (%)	50 % estävä pitoisuus (µg/ml)	Metastaasit (% verrokista) ^b
Heparini	Noin 60	100	>2000	20±3
Mannopentoosifosfaatti SO ₄ ^c	5	0,2	2	31±3
Raffinoosi SO ₄	3	1,6	200	48±9
Stakyoosi SO ₄	4	3,2	2000	36±4
Maltoosi SO ₄	2	0	2000	99±9
Maltotetroosi SO ₄	4	0,8	20	72±9
Maltoheksoosi SO ₄	6	1,6	2	24±7
Sykloheksa-amyloosi SO ₄	6	0,4	200	107±7
Syklohepta-amyloosi SO ₄	7	0,8	200	81±14
Syklo-okta-amyloosi SO ₄	8	1,6	200	36±6
Kondroitinitetra SO ₄	4	0	2000	EM
Kondroitiniheksa SO ₄	6	0,2	2000	EM
Kondroitiniokta SO ₄	8	EM	1000	EM
Suramiini	-	0,1	50	74±8

a Antikoaguloiva aktiivisuus prosentteina hepariinin aktiivisuudesta (100 %).

b Prosenttia vertailumetastaaseista ± keskiarvo (n=4) keuhkoissa rotilla, jotka saivat 13762 MAT -soluja i.v. ja 2 mg/rotta kutakin oligosakkaridia yhtä aikaa kasvainsolujen ruiskuttamisen kanssa. Alleiviivatut arvot edustavat yhdisteitä, joilla oli suurin nestastaaseja estävä vaikutus.

c Mannopentoosifosfaatti, joka eristettiin *Pichia holsitii*-hiivasta. EM = ei määritetty.

Taulukko 2
Sulfatoidun mannopentoosifosfaatin ja sulfatoitujen oligosakkaridien heparanaasiaktiivisuuden ja kasvutekijöiden heparaaniin sitoutumisen esto

Sulfatoitu oligosakkaridi	Sulfatointi ^a	Sulfatointi-%	Antikoaguloiva aktiivisuus (%) ^b	IC50 (µg/ml) ^c		
				Heparanaasi	bFGF	aFGF
Maltoosi	6/8	75	0,2	>100	>200	134
Maltotriooosi	10/11	91	0,8	100	145	58,7
Maltotetroosi	11/14	79	1,6	25	65	31,5
Maltopentoosi	15/17	88	3,2	4	37,5	27
Maltoheksooosi	18/20	90	2	5	31,3	27
Maltoheptoosi	18/23	78	3,9	3	10	27
Mannopentoosifosfaatti ^d	10/16	63	0,2	5	25	22
Maltoheksooosi	3/20	15	0	>100	187	>200
Maltoheksooosi	9/20	45	0,8	50	45,6	79
Maltoheksooosi	14/20	70	0,4	20	12,5	12,5
Maltoheksooosi	17/20	85	1,7	6	5,4	10,4
Maltoheksooosi	18/20	90	2	6	5,4	18,4
Maltoheksooosi	20/20	100	3,3	5	5,4	19,7

- a Kiinnittyneiden sulfaattiryhmien todellinen lukumäärä/ sulfaattiryhmien teoreettinen maksimilukumäärä, joka kuhunkin molekyyliin voi kiinnittyä.
- b Antikoaguloiva aktiivisuus prosentteina hepariinin aktiivisuudesta (100 %).
- c Yhdisteen pitoisuus, joka tarvitaan estämään 50 % ihmisen verihiutaleiden heparanaasiaktiivisuudesta tai hiiren 3T3-solujen sitoutumisen immobiilisoituu aFGF/bFGF:ään. Heparanaasikokeessa hepariinin IC50 oli 2 µg/ml.
- d Mannopentoosifosfaatti, joka eristettiin *Pichia holstii* -hiivasta. EM = ei määritetty.

Taulukko 3

Eri synteettisten oligosakkaridien sulfatoitujen muotojen heparanaasiaktiivisuuden ja kasvutekijöiden heparanaanisulfaatteihin sitoutumisen esto

Sulfatoitu oligosakkaridi	Sulfatointi ^a	Sulfatointi-%	Antikoaguloiva aktiivisuus (%) ^b	IC50 (µg/ml) ^c		
				Heparanaasi	bFGF	aFGF
Mannotriooosi	7/11	64	0,3	25	EM	EM
Mannotetroosi	10/14	71	0,4	6	20	5
Mannopentoosi	12/17	71	0,4	4	15	5
Mannohekssoosi	11/20	55	0,8	3	11	EM
Galaktotriooosi	6,6/11	60	0,7	4	25	EM
Galaktotetroosi	8,3/14	59	1,0	3,5	9	EM
Galaktohekssoosi	14,5/17	72,5	0,7	3,5	11	EM
Glukotriooosi	EM	EM	0,1	30	47	EM
Glukohekssoosi	13,4/20	67	0,4	3,5	15	EM

a Kiinnittyneiden sulfaattiryhmien todellinen lukumäärä/ sulfaattiryhmien teoreettinen maksimilukumäärä, joka kuhunkin molekyyliin voi kiinnittyä.

b Antikoaguloiva aktiivisuus prosentteina hepariinin aktiivisuudesta (100 %).

c Yhdisteen pitoisuus, joka tarvitaan estämään 50 % ihmisen verihiihtaleiden heparanaasiaktiivisuudesta tai hiiren 3T3-solujen sitoutumisen immobiilisoitua aFGF/bFGF:ään. Heparanaasikokeessa hepariinin IC50 oli 2 µg/ml.

EM = ei määritetty.

Taulukko 4

Sulfatoitujen oligosakkaridien vaikutus ilmataskutulehdukseen^a

Käsittely	Annos	Leukosyyttien infiltroituminen ilmataskuun ^b (% verrokista)	
		Koe 1	Koe 2
Maltoheksoosi SO ₄	50 mg/kg	76±7	44±12
Mannopentoosi SO ₄	50 mg/kg	57±7	16±2
Mannopentoosifosfaatti SO ₄ (<i>P. holstii</i>)	50 mg/kg	EM	51±9
Prednisoloni	25 mg/kg	56±14	44±3

- a** Ilmataskutulehdus, joka saatiin aikaan tioglykollaattiruiskeella ja leukosyyttien sisäänvirtaus määritettiin 17 tuntia myöhemmin. Lääkehoidot ruiskutettiin ihon alle samanaikaisesti tioglykokollaatin kanssa kokeessa 1. Kokeessa 2 sulfatoidut oligosakkaridit ruiskutettiin ihon alle 0 tuntia ja 7 tuntia tioglykokollaattiruiskeen jälkeen.
- b** Tulokset prosentteina verrokin ilmataskuun infiltroituneiden leukosyyttien määrästä ± keskivirhe. Verrokkeihin ruiskutettiin tioglykokollaattia, mutta ne eivät saaneet lääkettä, vaan pelkästään keittosuolaliuosta. Taustaleukosyytti-infiltraatio ilmataskuissa, joihin ruiskutettiin ainoastaan keittosuolaliuosta, oli 9±2 % tioglykokollaatin ruiskutuksen jälkeen todetusta.

EM = ei määritetty.

Taulukko 5

Sulfatoitujen oligosakkaridien vaikutus ovalbumiinilla (OVA) indusoituun eosinofiilien kasaantumiseen hiiren keuhkoihin^a

Sulfatoidut oligosakkaridit	Antotapa	Annos	Eosinofiilejä/ml BALB (% verrokista) ^b
Maltohekssoosi	pumppu, i.p.	50 mg/kg/vrk	57±2
Maltohekssoosi	pumppu, i.p.	115 mg/kg/vrk	9±7
Maltohekssoosi	aerosoli	10 mg/ml ^c	98±24
Maltohekssoosi	aerosoli	40 mg/ml ^c	63±23
Mannopentoosi	pumppu, i.p.	50 mg/kg/vrk	63±12

- a Hiiret herkistettiin OVA:lle ja sitten eosinofiilien virtaus keuhkoihin saatiin aikaan antamalla OVA:a aerosolina. Sulfatoituja oligosakkarideja annettiin joko i.p. miniosmoottisella pumpulla tai keuhkojen kautta aerosolina.
- b Tulokset ilmoitetaan prosentteina verrokin eosinofiilien lukumäärästä keuhkorakkuloiden pesunesteessä (BALB) ± keskivirhe, verrokkien ollessa eläimiä, jotka altistettiin OVA:lle ja jotka saivat keittosuolaliuosta joko miniosmoottisella pumpulla ja keuhkojen kautta aerosolina.
- c Sulfatoitujen oligosakkaridien pitoisuus aerosoliliuoksessa.

Taulukko 6

Sulfatoitujen oligosakkaridien vaikutus adoptiivisesti siirrettyyn kokeelliseen autoimmuunienkefalomyeliittiin (EAE)^a

Sulfatoitu oligosakkaridi^b	Rottia, joilla EAE/kaikki	Keskimääräinen puhkeamispäivä^c	Taudin vakavuus (% verrokista)^d
Verrokki	6/6	5,5 ± 0,2	100 ± 11
Mannopentoosi	3/5	5,3 ± 0,3	31,5 ± 15,1
Mannopentoosifosfaatti (<i>P. holstii</i>)	4/5	5,3 ± 0,3	47,9 ± 16,4

- a EAE indusoiittiin Lewisin rotissa käyttämällä 30×10^6 ConA -aktivoituja EAE-efektorisoluja.
- b Sulfatoidut oligosakkaridit annettiin ihon alle miniosmoottisilla pumpuilla, jotka asennettiin samaan aikaan solujen siirron kanssa, annoksen ollessa 70 mg/kg/vrk.
- c EAE:n keskimääräinen puhkeamispäivä eläimissä, joille tauti kehittyi.
- d Taudin vakavuus edustaa eläinten kliinisiä pisteitä yhteensä.

Taulukko 7

**Sulfatoidun mannopentoosifosfaatin vaikutus tulehdukselliseen
vatsatautiin hiirissä^a**

Päivä ^b	Hoitamattomat ^c		Hoidetut ^c	
	Keskim. tautipisteet ^d	Ruumiin- paino (g)	Keskim. tautipisteet ^d	Ruumiin- paino (g)
0	0	23,1	0	22,1
1	0	23,2	0	22,1
2	0	23,6	0	22,6
3	0	23,5	0	22,5
4	0	23,3	0	21,9
5	0	23,4	0	21,9
6	0,47	23,3	0,07	22,4
7	1,40	22,7	0,40	22,4
8	2,47	22,1	0,40	22,3
9	2,87	21,4	0,67	22,2
10	2,00	20,7	0,93	22,1

a Tulehduksellinen vatsatauti, joka indusoitiin antamalla dekstraanisulfaattia juomavedessä.

b Päivät dekstraanisulfaatin annon aloittamisen jälkeen.

c Hoitamattomat eläimet saivat kolmesti päivässä vehikkeliruiskeen, kun taas hoidetut eläimet saivat kolmesti päivässä ruiskeena sulfatoitua mannopentoosifosfaattia annoksena 20 mg/kg/vrk..

d Keskimääräiset tautipisteet edustavat ripuli- ja rektaalivuotopisteiden summaa eläimillä kunakin ajankohtana.

Viitejulkaisut

1. Dietrich, C.P., Nader, H.B. ja Strauss, A.J. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **111** 865-871.
2. Kjellen, L. ja Lindahl, U. (1991). *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475.
- 5 3. David, G. (1993). *FASEB J.* **7**, 1023-1030.
4. Esko, D.J. (1991). *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 805-816.
5. Cole, G.J. ja Akesson, R. (1989). *Neuron* **2**, 1157-1165.
6. Coombe, D.R., Watt, S.M. ja Parish, C.R. *Blood* **84**, 739-752.
7. Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. ja Ornitz, D.M. (1991).
10 *Cell* **64**, 841-848.
8. Rapraeger, C.A., Krufka, A. ja Olwin, B.B. (1991). *Science* **252**, 1705-1708.
9. Gitay-Goren, H., Soker, S., Vlodaysky, I. ja Neufeld, G. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 6093-6098.
10. Yurchenco, P.D. ja Schnittny, J.C. (1990). *FASEB J.* **4**, 1577-1590.
- 15 11. Stetler, S.W., Aznavoorian, S. ja Liotta, L.A. (1993). *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 541-573.
12. Eldor, A., Bar-Ner, N., Fuks, Z. ja Vlodaysky, I. (1987). *Semin Thromb. Hemost.* **13**, 475-488.
13. Nakajima, M., Irimura, T. ja Nicolson, G.L. (1988). *J. Cell Biochem.* **36**,
20 157-167.
14. Turnbull, J.E., Fernig, D.G., Ke, Y., Wilkinson, M.C. ja Gallagher, J.T. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 10337-10341.
15. Mach, H., Volkin, D., Burke, C.J., Middaugh, C.R., Linhardt, R.J., Fromm, J.R. ja Loganathan, D. (1993). *Biochemistry* **32**, 5480-5489.
- 25 16. Nurcombe, V., Ford, M.D., Windschut, J.A. ja Bartlett, P.F. (1993). *Science* **260**, 103-106.

17. Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. ja Lax, I. *Cell* **79**, 1015-1024.
18. Folkman, J. ja Brem, H. (1992). *Angiogenesis and inflammation*. Teoksessa: "Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates". Toim. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. ja Snyderman, R.S., Raven Press, New York.
19. Folkman, J. (1991). *Tumour angiogenesis*. Teoksessa: "Cancer Medicine". Toim. Holland, J.F., Lea & Febiger, Philadelphia.
20. Folkman, J. ja Klagsburn, M. (1987). *Science* **235**, 442-447.
- 10 21. Ratner, S. (1992). *Invasion Metastasis* **12**, 82-100.
22. Mora, P.T. ja Wood, D., *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 693.
23. O'Colla, P.S. ja Lee, E.E. (1964). *J. Chem. Soc.* 2351-2354.
24. Evans, W.L., Reynolds, D.D. ja Talley, E.A. (1951). *Adv. Carbohydr. Chem.* **6**, 27.
- 15 25. Goldstein, I.J. ja Hullar, T.L. (1966). *Adv. Carbohydr. Chem.* **21**, 431-512.
26. Haq, S. ja Whelan, W.J. (1956). *J. Chem. Soc.* 4543.
27. Okada, M., Sumitomo, H., Sumi, K. ja Sugimoto, T. (1984). *J. Amer. Chem. Soc.* **17**, 2451-2453.
28. Okada, M., Sumitomo, H., Hirasawa, T., Ihara, K. ja Tada, Y., (1986). *Polym. J.*, (Tokyo), **18**, 601-611.
- 20 29. O'Colla, P.S. ja McGrath, D., (1962). *Chem. Ind.*, 178-179.
30. McGrath, D., Lee, E.E. ja O'Colla, P.S., (1969). *Carbohydrate Res.*, **11**, 453-460.
31. Reynolds, D.D. ja Evans, W.L., *J. Amer. Chem. Soc.* (1947), **69**, 66.
- 25 32. Glaser, J.H. ja Conrad, H.E. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 6588-6597.
33. Anderson, R.F., Cadmus, M.C., Benedict, R.G. ja Slodki, M.E. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 289-292.

34. Bretthauer, R.K., Kaczorowski, G.J. ja Weise, M.J. (1973), *Biochemistry* **12**, 1251-1256.
35. Parish, C.R., Coombe, D.R., Jakobsen, K.B., Bennett, F.A. ja Underwood, P.A. (1987). *Int. J. Cancer* **40**, 511-518.
- 5 36. Guo, Y. ja Conrad, H.E. (1989). *Anal. Biochem.* **176**, 96-104.
37. Rylatt, D.B., Sia, D.Y., Mundy, J.R. ja Parish, C.R. (1981). *Eur. J. Biochem.* **119**, 641-646.
38. Brown, K.J., Hendry, I.A. ja Parish, C.R. (1995). *Exp. Cell Res.* **217**, 132-139.
39. Brown, K.J. ja Parish, C.R. (1994). *Biochemistry* **33**, 13918-13927.
- 10 40. Forrest, M.J., Brooks, P.M., Takagi, T. ja Kowanko, I. (1988). Teoksessa: "CRC Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases". Toim. Greenwald, R.A. ja Diamond, K.S., CRC Press, Boca Raton, Vol. 1, s.125.
41. Foster, P.S., Hogan, S.P., Ramsay, A.J., Matthaei, K.I. ja Young, (1996). *J. Exp. Med.* **183**, 195-201.
- 15 42. Lelievre, S. ja Larsen, A.K. (1994), *Cancer Res.* **54**, 3993-3997.
43. Willenborg, D.O. ja Parish, C.R. (1988). *J. Immunol.* **140**, 3401-3405.
44. Bartlett, M.R., Cowden, W.B. ja Parish, C.R. (1995). *J. Leuk. Biol.* **57**, 207-213.

Patenttivaatimukset

1. Sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridilla on yleinen kaava I:



5 jossa R_1 ja R_2 ja kaikki R_x -ryhmät edustavat monosakkaridiyksikköjä, jotka kaikki voivat olla samoja tai erilaisia, vierekkäisten monosakkaridiyksikköjen liittyessä toisiinsa 1→2, 1→3, 1→4 ja/tai 1→6 glykosidisidoksilla, ja n on jokin kokonaisluku 1 - 6.

10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että n on 1 - 4, edullisesti 3 tai 4.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että monosakkaridiyksiköt ovat heksooseja, jotka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat fruktoosi, glukoosi, mannoosi, altroosi, alloosi, taloosi, galaktoosi, idoosi ja guloosi.

15 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridilla on yleinen kaava II:



20 jossa kaikki R_y -ryhmät ovat samoja ja edustavat monosakkaridiyksikköjä, vierekkäisten monosakkaridiyksikköjen liittyessä toisiinsa 1→3, 1→4 ja/tai 1→6 glykosidisidoksilla, ja n on jokin kokonaisluku 1 - 6.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että n on 1 - 4, edullisesti 3 tai 4.

25 6. Patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että R_y on monosakkaridiyksikkö, joka on jokin heksoosi, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat glukoosi, mannoosi, altroosi, alloosi, taloosi, galaktoosi, idoosi ja guloosi.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että R_y on glukoosi, mannoosi tai galaktoosi.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridi on jokin luonnossa esiintyvä oligosakkaridi.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridi on valittu raffiinosin ja stakyoosin joukosta.

5 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridi on valmistettu entsyymaattisesti tai kemiallisesti hajottamalla jotakin luonnossa esiintyvää polysakkaridia.

10 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridi on jokin amyloosista, kondroitiinista tai dekstraanista johdettu oligosakkaridi.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridi on valittu maltotetroosin, maltopentoosin, maltoheksosin, glukotri-
oosin, glukotetroosin, glukopentoosin ja kondroitiinitetra-, kondroitiiniheksa- ja
kondroitiinioktasakkaridien joukosta.

15 13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen sulfatoitu oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että oligosakkaridi on mannopentoosifosfaatti, joka on peräisin *Pichia holstii* -hiivasta.

20 14. Menetelmä ihmispotilaan tai muun lämminverisen eläinpotilaan, joka tarvitsee tällaista hoitoa, hoitamiseksi angiogeneesiä, metastaaseja ja/tai tulehdusta vastaan, **tunnettu** siitä, että potilaalle annetaan tehokas määrä vähintään yhtä minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 13 mukaista sulfatoitua oligosakkaridia.

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 3 mukaisen sulfatoidun oligosakkari-
din käyttö antiangiogeenisenä, antimetastaattisena ja/tai anti-inflammatorisena ai-
neena lämminverisen eläinpotilaan (ihminen mukaanluettuna) hoidossa.

25 16. Patenttivaatimuksen 14 tai 15 mukainen menetelmä tai käyttö, **tunnettu** siitä, että hoito käsittää jonkin angiogeenisestä riippuvaisen taudin, mukaanluettuina an-
giogeneesi, joka liittyy kiinteiden kasvainten kasvuun, proliferatiivisiin retinopati-
oihin ja nivelreumaan, hoidon.

30 17. Patenttivaatimuksen 14 tai 15 mukainen menetelmä tai käyttö, **tunnettu** siitä, että hoito käsittää tulehdussairauksien ja tilojen, joissa heparanaasia estävä aktiivi-
suus estää leukosyyttien infiltroitumista, mukaanlukien krooniset tulehdustaudit,
kuten nivelreuma, multippeliskleroosi, insuliinista riippuvainen diabetes mellitus,

sellaiset taudit kuten ulseratiivinen koliitti ja Chronin tulehduksellinen vatsatauti, vierassiirteiden hyljintä ja krooninen astma, hoidon.

18. Farmaseuttinen tai eläinlääkinnällinen koostumus, joka on tarkoitettu angiogeneesin, metastaasien ja/tai tulehduksen vastaiseen hoitoon, **tunnettu** siitä, että se käsittää vähintään yhden minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 13 mukaisen sulfatoidun oligosakkaridin yhdessä jonkin farmaseuttisesti ja eläinlääkinnällisesti hyväksyttävän kantajan tai laimenteen kanssa.
19. Vähintään yhden minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 13 mukaisen sulfatoidun oligosakkaridin käyttö valmistettaessa lääkettä ihmisen tai muun lämminverisen eläinpotilaan antiangiogeeniseen, antimetastaattiseen ja/tai anti-inflammatoriseen hoitoon.
20. Oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että sillä on yleinen kaava II:



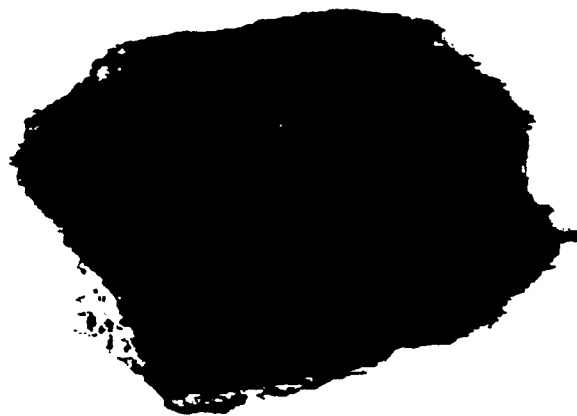
- jossa jokainen R_y -ryhmä on samanlainen ja kukin edustaa monosakkaridiyksikköä, vierekkäisten monosakkaridiyksikköjen liittyessä toisiinsa 1→3, 1→4 ja/tai 1→6 glykosididisidoksilla, ja n on jokin kokonaisluku 1 - 6.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että n on 1 - 4, edullisesti 3 tai 4.
22. Patenttivaatimuksen 20 tai 21 mukainen oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että R_y on monosakkaridiyksikkö, joka on jokin heksoosi, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat glukoosi, mannoosi, altoosi, alloosi, taloosi, galaktoosi, idoosi ja gulooosi.
23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että R_y on glukoosi, mannoosi tai galaktoosi.
24. Patenttivaatimuksen 20 mukainen oligosakkaridi, **tunnettu** siitä, että R_y on jokin täysin O-asetyloitunut monosakkaridi tai että R_y on monosakkaridi, joka on täysin O-esteröity jollakin muulla asyyliosalla kuin asetyyllillä.

Figure 1



angiogeneesiverrokki



20 µg/ml maltoheksosisulfaattia

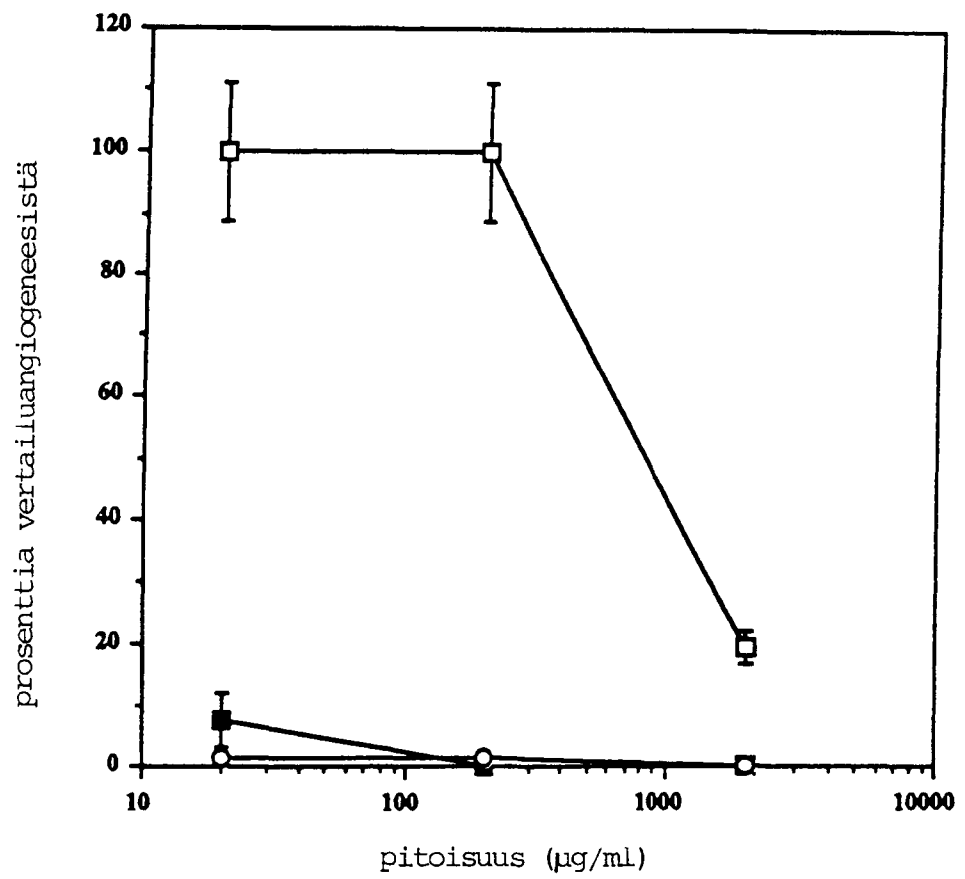
Figure 2

Figure 4

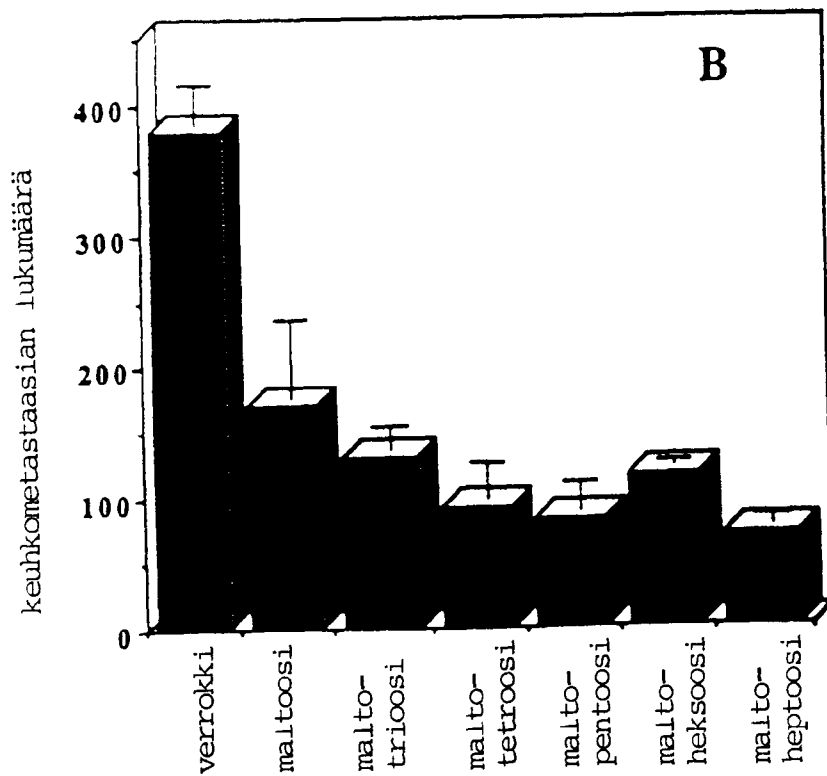
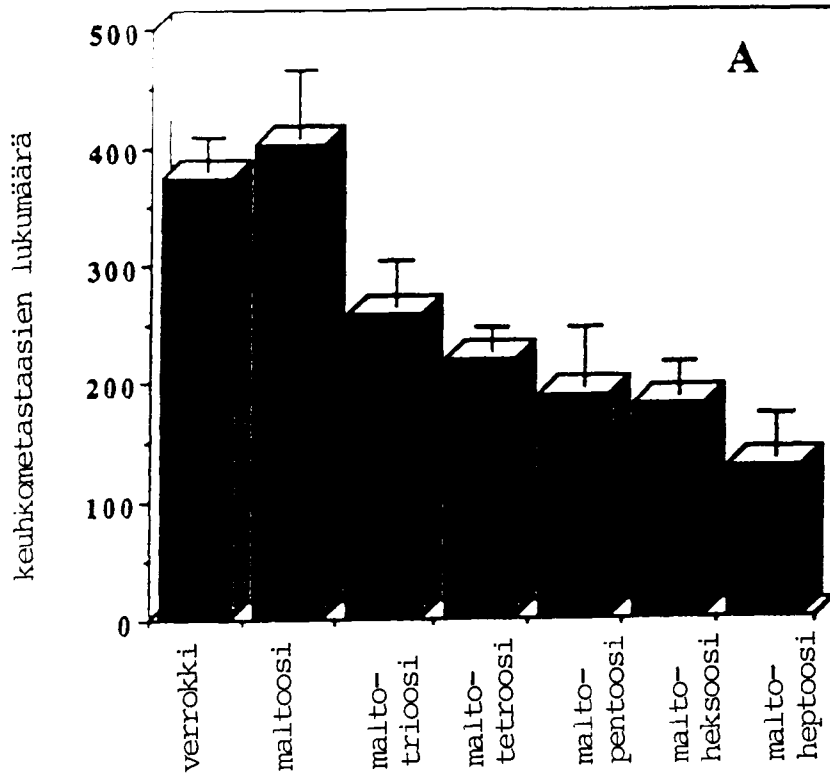


Figure 5

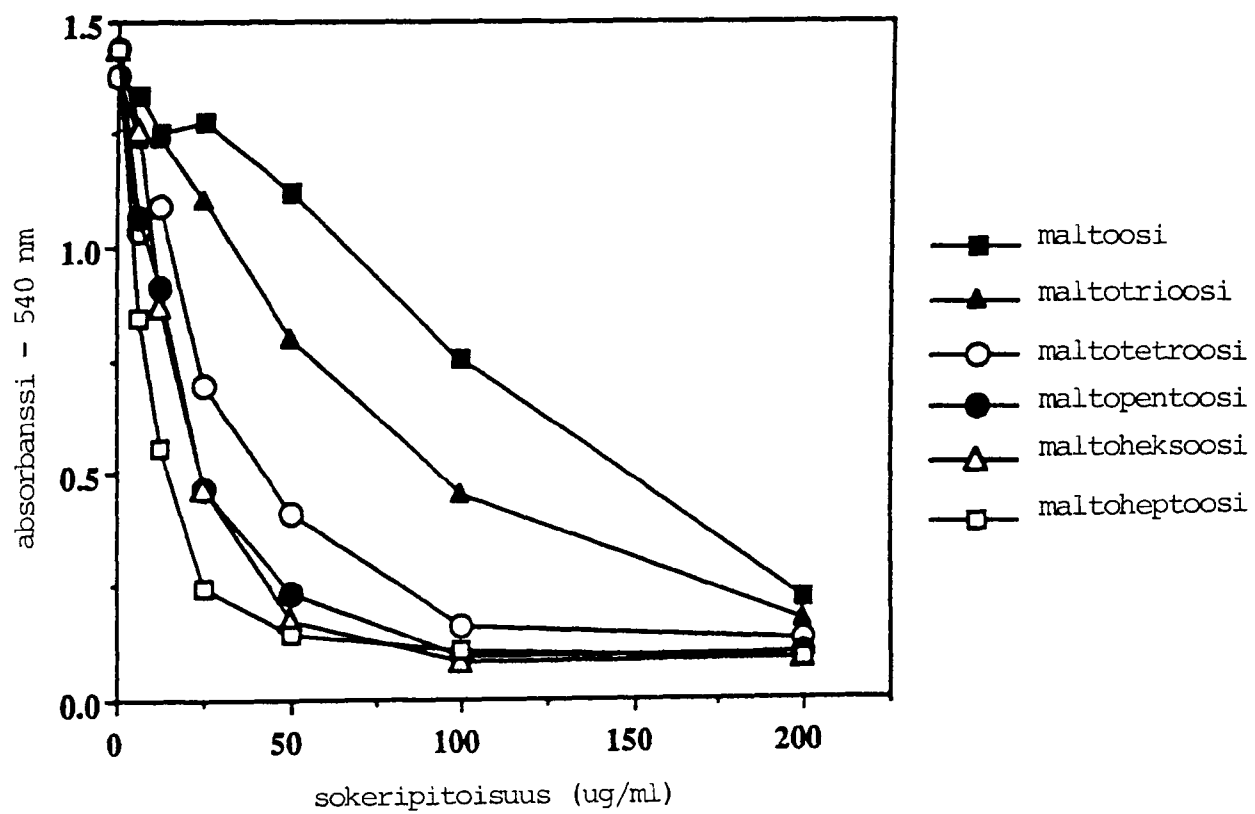
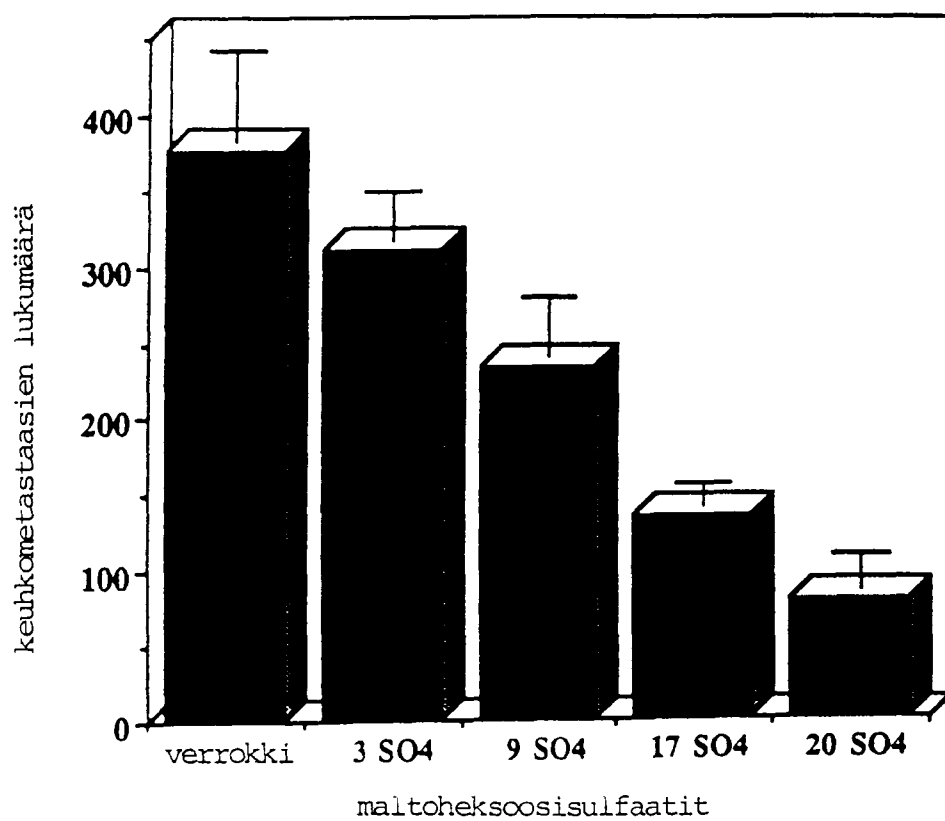


Figure 6



02.05.2008

02.05.2008

Figure 7

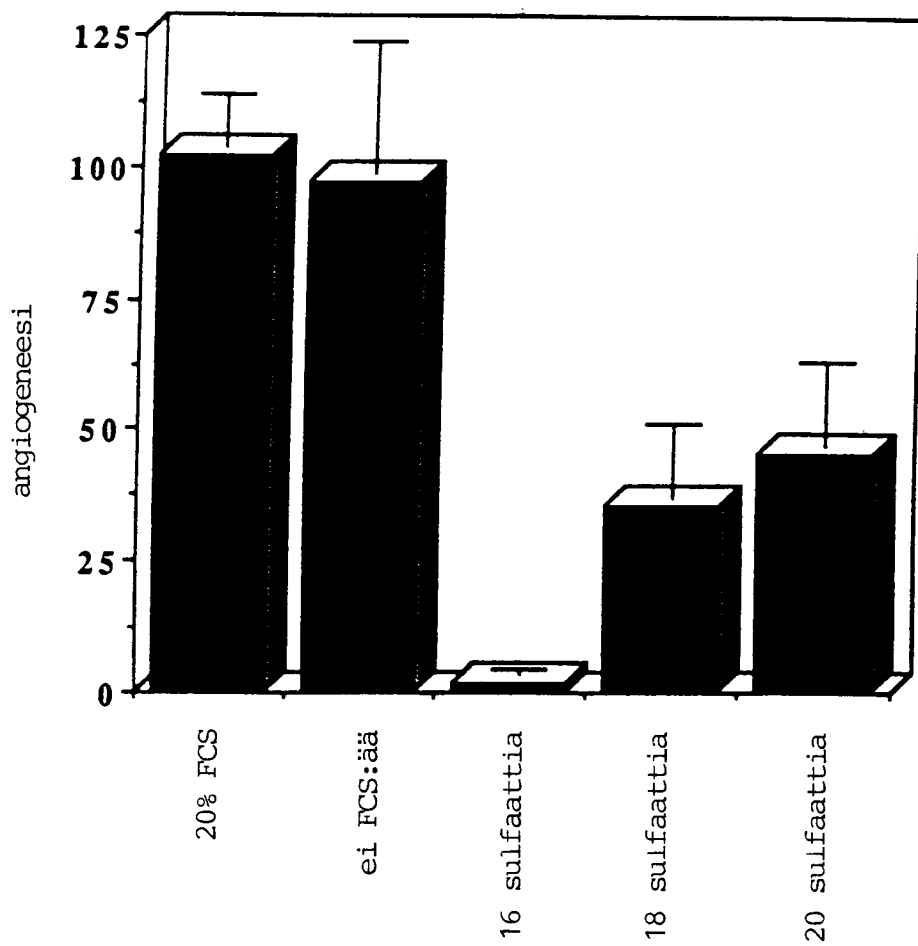


Figure 8

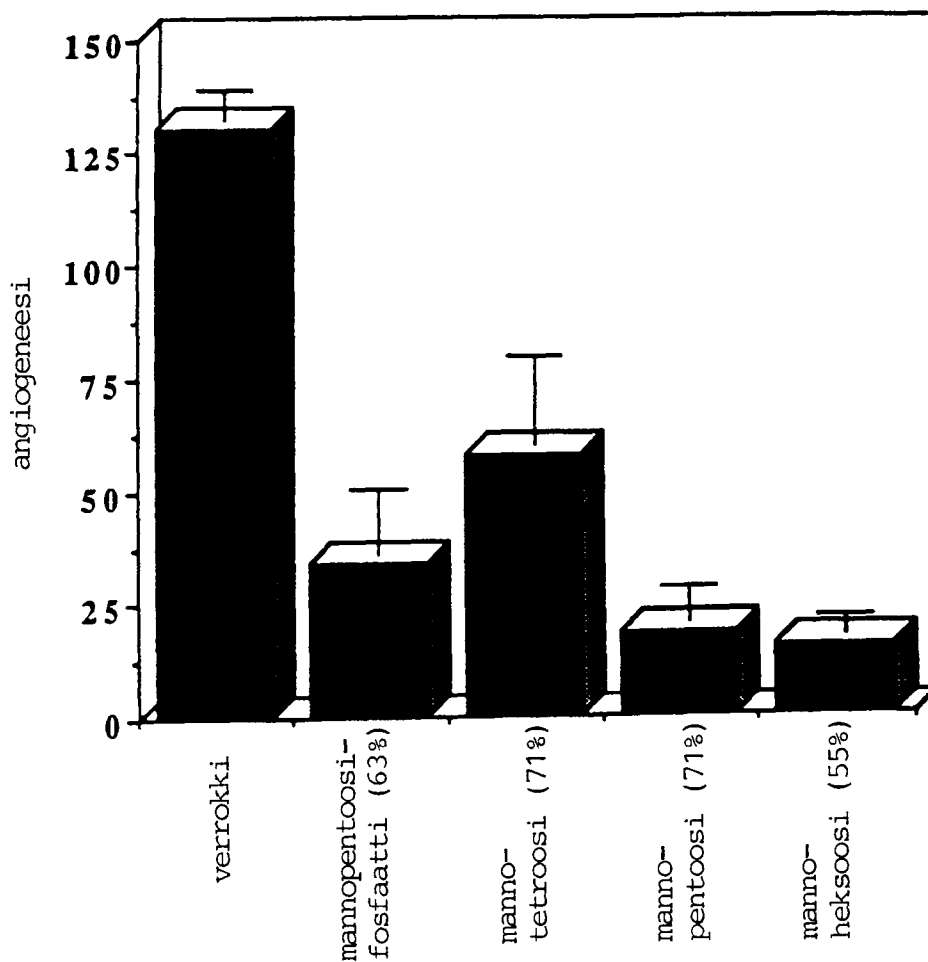


Figure 9

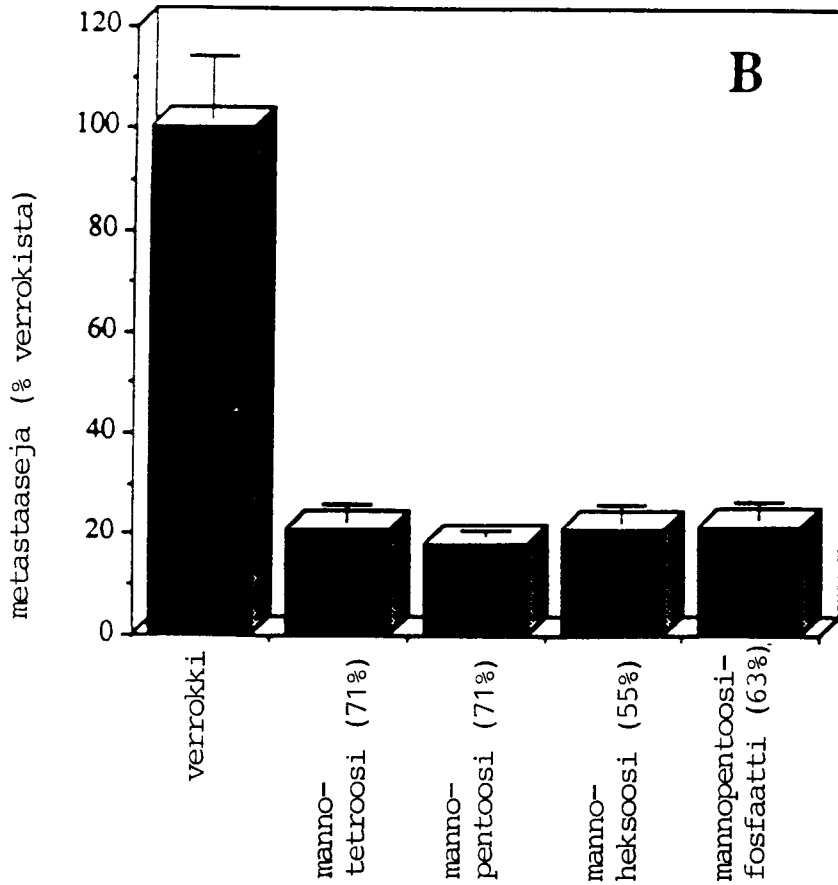
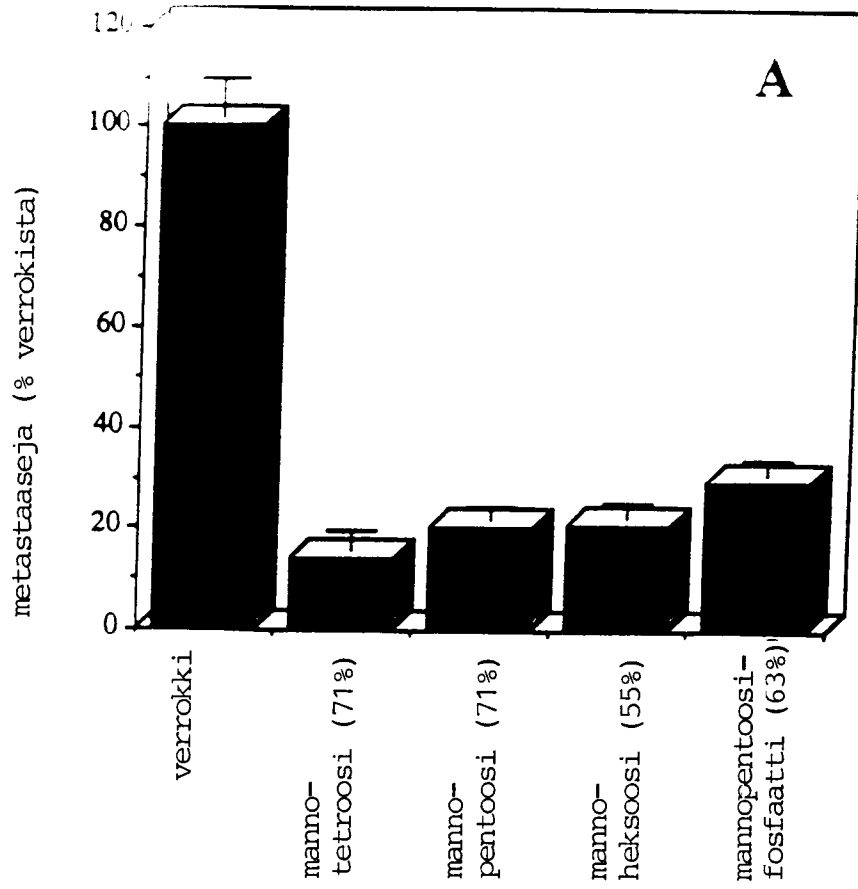


Figure 10

