

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2002 - 1385**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.10.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.10.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9913182**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.07.2002**  
(Věstník č. 7/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/FR00/02897**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/29055**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 H 3/06**  
**C 08 B 37/00**  
**A 61 K 31/702**  
**A 61 P 9/10**  
**A 61 P 19/00**  
**A 61 P 25/14**  
**A 61 P 25/16**  
**A 61 P 25/28**

(71) Přihlašovatel:

**AVENTIS PHARMA S. A., Antony, FR;**

(72) Původce:

**Mourier Pierre, Charenton le Pont, FR;**  
**Perrin Elisabeth, Evreux, FR;**  
**Viskov Christian, Ris Orangis, FR;**  
**Stutzmann Jean-Marie, Villecresnes, FR;**  
**Wahl Florence, Paris, FR;**

(74) Zástupce:

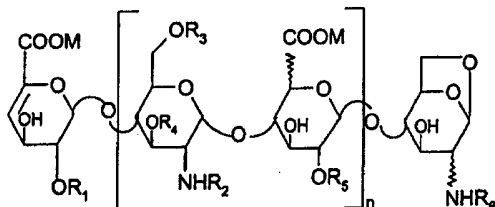
**Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nové oligosacharidy, způsob jejich přípravy a farmaceutické kompozice tyto oligosacharidy obsahující**

(57) Anotace:

Vynález se týká oligosacharidů obecného vzorce I, jejich směsí, jejich diastereoizomerů, způsobu jejich přípravy a farmaceutických kompozic, které tyto oligosacharidy obsahují jako účinnou látku.



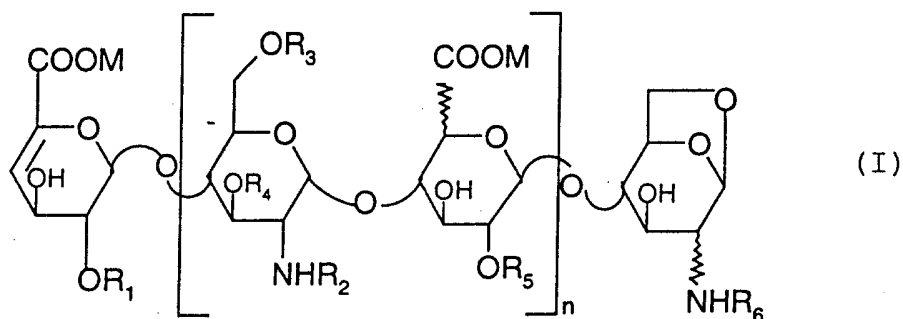
19.04.02

180536/HK

Nové oligosacharidy, způsob jejich přípravy a farmaceutické kompozice tyto oligosacharidy obsahující

### Oblast techniky

Vynález se týká oligosacharidů obecného vzorce I



jejich směsí, jejich diastereoizomerů, způsobu jejich přípravy a farmaceutických kompozic, které tyto oligosacharidy obsahují.

### Dosavadní stav techniky

Sulfátované disacharidy mající na redukčním konci 1,6-anhydro-strukturu byly popsány H.P.Wessel-em v J.Carbohydrate Chemistry, 11(8), 1039-1052 (1992), přičemž v této publikaci nebyla pro tyto sloučeniny popsána žádná farmakologická účinnost.

Sulfátované trisacharidy obsahující opakující se strukturní jednotku 1,6-anhydro byly rovněž popsány v patentu EP 84 999 a autory Y.Ichikawa a kol. v

Carbohydr.Res, 141, 273-282 (1985) jako meziprodukty pro přípravu vyšších oligosacharidů. Tyto trisacharidy mají slabou účinnost anti-Xa.

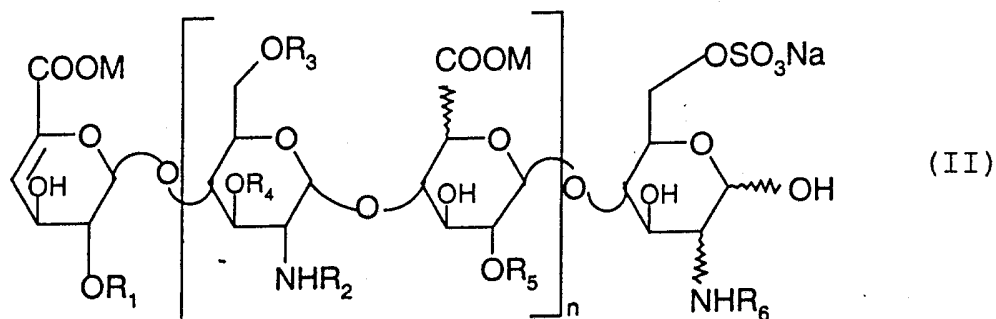
Ve výše uvedeném obecném vzorci I n znamená celé číslo 0 až 25,  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  a  $R_5$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo skupinu  $SO_3M$ ,  $R_2$  a  $R_6$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo skupinu  $SO_3M$  nebo skupinu  $COCH_3$  a M znamená sodík, vápník, hořčík nebo draslík.

Tyto oligosacharidy takto obsahují sudý počet sacharidů.

V obecném vzorci I  $R_4$  výhodně znamená atom vodíku.

V obecném vzorci I n výhodně znamená celé číslo 0 až 10, zejména 0 až 6 a obzvláště 1 až 6.

Oligosacharidy obecného vzorce I mohou být připravené působením hydroxidu alkalického kovu nebo kvartérního amoniumhydroxidu na oligosacharidy obecného vzorce II



ve kterém n znamená celé číslo 0 až 25,  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  a  $R_5$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo

skupinu  $\text{SO}_3\text{M}$ ,  $\text{R}_2$  a  $\text{R}_6$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo skupinu  $\text{SO}_3\text{M}$  nebo skupinu  $\text{COCH}_3$  a M znamená sodík, vápník, hořčík nebo draslík nebo jejich směs.

Tato reakce se provádí ve vodném prostředí při teplotě 40 až 80 °C a hodnotě pH 10 až 13.

Jako použitelný hydroxid alkalického kovu lze uvést, hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid litný a hydroxid cesný.

Jako použitelný kvartérní amoniumhydroxid lze uvést tetrabutylamoniumhydroxid.

Množství hydroxidu alkalického kovu nebo kvartérního amoniumhydroxidu musí být dostatečné k tomu, aby hodnota pH reakční směsi zůstala stejná v průběhu celé doby trvání reakce. Takto je tedy nezbytné v průběhu reakce kontinuálně přidávat hydroxid alkalického kovu nebo kvartérní amoniumhydroxid.

Výhodně je hydroxid alkalického kovu nebo kvartérní amoniumhydroxid ve formě 1 až 5% vodného roztoku.

Výhodně se reakce provádí při teplotě 60 až 70 °C.

Výhodně hodnota pH reakční směsi činí 11 až 12,5.

Reakce se přeruší okyselením reakční směsi, například přidáním kyselé pryskyřice, jakou je například pryskyřice Amberlite IR120<sup>R</sup> (Fluka).

Oligosacharidy obecného vzorce I mohou být případně přečistěny permeační gelovou chromatografií za použití gelu polyakrylamid-agarosového typu, jakým je komerčně dostupný gel Ultrogel ACA202<sup>R</sup> (Biosepra), prováděnou postupem, který je dále popsán pro separaci meziproduktových oligosacharidů obecného vzorce II. Oligosacharidy obecného vzorce I, ve kterém  $n$  znamená 0 nebo 1, mohou být také případně přečistěny na sloupci aluminy za použití eluční soustavy tvořené směsí vody a ethanolu.

Meziproduktové oligosacharidy obecného vzorce II a jejich směsi mohou být získány chromatografickou separací na gelu směsi oligosacharidů III získanou enzymatickou depolymerací heparinu nebo bázickou depolymerací benzylesteru heparinu nebo polosyntetického benzylesteru heparinu.

Tato chromatografie se provádí v kolonách naplněných gelem polyakrylamid-agarosového typu, jakým je například gel, který je komerčně dostupný pod obchodním označením Ultrogel ACA202<sup>R</sup> (Biosepra). Výhodně se použije baterie kolon naplněných polyakrylamid-agarosovým gelem. Počet použitých kolon je závislý na objemu, samotném gelu a na oligosacharidech, které mají být rozděleny. Směs se eluuje roztokem obsahujícím fosfátový pufr a chlorid sodný. Výhodně je roztokem fosfátového pufru roztok obsahující 0,02 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7) a 0,1 mol/l chloridu sodného. Detekce jednotlivých frakcí se provádí za použití ultrafialové (254 nm) a iontové (IBF) spektrometrie. Takto

získané frakce mohou být potom případně přečistěny například chromatografií SAX (strong anion exchange) postupy, které jsou pro odborníky známé, a zejména postupy popsány K.G.Rice-m a R.J.Linhardt-em v Carbohydrate Research 190, 219-233 (1989), A.Larnkjaer-em, S.H.Hansen-em a P.B.Ostergaard-em v Carbohydrate Research, 266, 37-52 (1995) a v patentovém dokumentu WO90/01501 (příklad 2). Tyto frakce se potom lyofilizují a potom odsolí na koloně naplněné gelem, jakou je například kolona s gelem Sephadex G10 (Pharmacia Biochemicals).

V případě, že se přečistění neprovádí chromatografií SAX, mohou být lyofilizáty případně přečistěny jednoduchým nebo frakčním vysrážením prováděným postupy, které jsou odborníkům známé, zejména postupem popsáným ve francouzském patentu FR 2 548 672. Obecně se pracuje následujícím způsobem.

Lyofilizovaná frakce určená k přečistění se rozpustí při teplotě asi 25 °C v asi deseti objemech destilované vody. Přídavkem methanolu nebo ethanolu se vysráží požadovaný oligosacharid, přičemž se kontroluje jeho čistota vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií (CLHP, Chromatographie Liquide Haute Performance). Přídavek methanolu nebo ethanolu se určí v závislosti na požadované čistotě a výtěžku uvedeného oligosacharidu. Stejně tak může být tato operace provedena v několika následných stupních, přičemž se vychází z původního roztoku lyofilizátu. Za tím účelem se přidává nesolubilizující činidlo (methanol nebo ethanol) v malých dávkách a po každém přídavku uvedeného činidla se izoluje získaná sraženina. Takto získané sraženiny se analyzují vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií. Podle požadované čistoty a požadovaného

výtěžku se sloučí pouze ty frakce sraženiny, které uvedenou požadovanou čistotu a požadovaný výtěžek zaručují.

V případě meziproduktů obecného vzorce II, ve kterém  $n = 0, 1$  nebo  $2$  je výhodné vycházet ze směsi III získané enzymatickou depolymerací.

Tato enzymatická depolymerace se provádí za použití heparinu I (EC 4.2.2.7) v prostředí roztoku fosfátového pufru s pH 7 v přítomnosti chloridu sodného a bovinního sérového albuminu (BSA) při teplotě mezi  $10$  a  $18^{\circ}\text{C}$ , výhodně při teplotě  $15^{\circ}\text{C}$ , po dobu 8 až 10 dnů, výhodně po dobu 9 dnů. Tato depolymerace se přeruší například zahřátím reakční směsi na teplotu  $100^{\circ}\text{C}$  po dobu 2 minut, načež se směs zpracuje lyofilizací. Je výhodné použít 7 UI heparinázy I na 25 g heparinu. Roztok fosfátového pufru obecně obsahuje  $0,05 \text{ mol/l NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7) v přítomnosti  $0,1 \text{ mol/l}$  chloridu sodného. Koncentrace bovinního sérového albuminu obecně činí 2 %.

Pokud jde o meziprodukty obecného vzorce II, ve kterém  $n = 0, 1, 2, 3$  nebo  $4$ , je výhodné vycházet ze směsi III získané depolymerací benzylesteru heparinu.

Benzylester heparinu může být připraven postupy popsány v patentových dokumentech US 5 389 618, EP 40 144 a FR 2 548 672. Stupeň esterifikace bude výhodně činit 50 až 100 %. Výhodně se bude míra esterifikace pohybovat v rozmezí od 70 do 90 %.

Uvedená depolymerace se provede ve vodném prostředí pomocí hydroxidu alkalického kovu (například hydroxid lithný, hydroxid sodný, hydroxid draselný nebo hydroxid cesný) nebo kvartérního amoniumhydroxidu (například tetrabutylamoniumhydroxid), výhodně při molaritě 0,1 až 0,2 mol/l, při teplotě 40 až 80 °C a po dobu 5 až 120 minut. V rámci výhodného provedení se pracuje po dobu 5 až 15 minut, při teplotě 60 až 70 °C a za použití roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,15 mol/l. Depolymerační reakce se přeruší neutralizací přidáním kyseliny, jakou je například kyselina octová. Po přidání 10 % hmotn./obj. octanu sodného se směs oligosacharidů vysráží přidáním methanolu, výhodně 2 objemu methanolu na 1 objem reakční směsi, a zfiltruje.

V rámci výhodného provedení vynálezu se směs oligosacharidů, získaná po chemické depolymeraci ve formě vodného roztoku, obohatí ultrafiltrací na membránách s příslušným nominálním separačním prahem (typ Pellicon z regenerované celulózy komerčně dostupný u společnosti Millipore), přičemž typ membrány je zvolen v závislosti na typu obohaceného oligosacharidu, který má být izolován. V případě oligosacharidů obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 0, se použije membrána s nominálním separačním prahem rovným 1 kDa, v případě oligosacharidů obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 1, se použije membrána se separačním prahem 1 kDa nebo 3 kDa, v případě oligosacharidů obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 2, se použije membrána se separačním prahem 3 kDa, a v případě oligosacharidů obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 3 nebo 4, se použije membrána se separačním prahem 5 kDa. V průběhu této operace se permeát zachová, zatímco zadržený podíl se považuje za odpad. Takto frakce obohaceného produktu může představovat 50 až 10 % výchozí směsi oligosacharidů, přičemž se zachová alespoň 80 % požadovaného oligosacharidu.

V případě meziproduktů obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 0 až 25, je výhodné vycházet ze směsi III získané depolymerací benzylesteru polosyntetického sulfátovaného polysacharidu. Uvedený benzylester polosyntetického sulfátovaného polysacharidu se připraví z polosyntetických sulfátovaných polysacharidů získaných z polysacharidu K5 postupy popsány v patentových dokumentech WO94/29352 a WO96/14425. Esterifikační, depolymerační a izolační podmínky jsou stejné jako podmínky popsané výše pro benzylester heparinu.

Ve všech výše uvedených postupech může být výchozí heparin vepřového, ovčího, kozího nebo bovinního (hovězího) původu a může pocházet z hlenu, plic nebo kůže zvířat. Výhodně se použije heparin z vepřového nebo ovčího hlenu nebo z hovězích plic a výhodněji heparin z vepřového hlenu.

Oligosacharidy obecného vzorce I mají protizáněťové vlastnosti a mohou být takto použity pro prevenci nebo léčení onemocnění spojených se záněťovými procesy zahrnujícími produkci cytotoxických látek, jakou je například oxid dusnatý (NO), jehož indukovatelná forma je uvolňována zejména neutrofily nebo makrofágy v případě, že migrují a jsou aktivovány v úrovni tkáně. Aktivace, migrace, adheze a infiltrace neutrofilů probíhá v úrovni tkáňových zón ischemizovaných následkem okluze nebo spasmu vaskularizující tepny uvedené tkáně. K těmto ischemiím může docházet buď v cerebrální úrovni (vaskulární mozková příhoda), nebo v úrovni myokardu (infarkt myokardu) anebo v úrovni dolních končetin (tak zvané periferní ischemie).

Oligosacharidy obecného vzorce I mohou být takto použity pro prevenci nebo/a léčení neurodegenerativních

onemocnění, u kterých cerebrální zánět hraje zhoubnou roli vedoucí případně ke smrti, přičemž z těchto onemocnění lze uvést cerebrální ischemie, srdeční ischemie (infarkt myokardu), periferní ischemie, poranění centrální nervové soustavy a zejména poranění lebky, páteře nebo kombinovaná poranění lebky a páteře, roztroušená skleróza, neuropatické bolesti a periferní neuropatie, nemoci motoneuronu a z nich zejména amyotrofní laterální skleróza, neuro-AIDS, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova chorea a některé formy osteoartritid, zejména v úrovni kloubů.

Protizáněťová účinnost uvedených produktů je demonstrována in vivo v rámci testu produkce  $\text{NO}_x$  (dusitan a dusičnan) indukované lipopolysacharidem (LPS) pocházejícím z *Escherichia Coli*, přičemž tento test se provádí podle protokolu popsánoho autory M.Yamashita a kol. v Eur.J.Pharmacol., 338, 2, 151-158 (1997) nebo autory J.E.Shellito a kol. v Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 13, 1, 45-53 (1995).

Myším samečkům CD1 (Charles River) s tělesnou hmotností mezi 25 a 35 g se v čase  $T_0$  intravenózně injikuje bolus 0,5 mg/kg oligosacharidu, načež se jim v čase  $T+15$  minut subkutánně injikuje 1 nebo 2 mg/kg oligosacharidu. V čase  $T+30$  minut se jim podá 100 mg/kg lipopolysacharidu (LPS) pocházejícího z *Escherichia Coli* (Sigma L3129, serotyp 0127:B8). V čase  $T+3$  hodiny se pokusným zvířatům opětovně subkutánně injikuje 1 nebo 2 mg/kg oligosacharidu. V čase  $T+5$  hodin a 30 minut se pokusným zvířatům oční punkcí odebere vzorek krve a v plasmě krevního vzorku se stanoví koncentrace  $\text{NO}_x$  (dusitan a dusičnan) Griessovou kolorimetrickou metodou po redukci dusičnanu na dusitan nitrát-reduktázou za použití následujícího postupu: 12

mikrolitru vzorku plazmy se smísí s 88 mikrolitry deionizované vody a získaná směs se inkubuje za tmy po dobu jedné hodiny při okolní teplotě v přítomnosti 40 mikrolitrů fosfátového pufru (0,31M, pH 7,5), 20 mikrolitrů beta-NADPH (redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát) (0,86 mM), 20 mikrolitrů FDA (flavinadenindinukleotid) (0,11 mM) a 20 mikrolitrů nitrát-reduktázy (2U/ml) (Boehringer Mannheim). Ke směsi se potom přidá 10 mikrolitrů  $\text{ZnSO}_4$  (1M) za účelem vysrážení proteinů a po promíchání se vzorky odstředí při 20000g po dobu 5 minut. Nakonec se 50 mikrolitrů supernatantu inkubuje po dobu 10 minut při okolní teplotě v přítomnosti 100 mikrolitru Griessova reakčního činidla (1% sulfanilamid ve 0,1% směsi kyseliny fosforečné a naftylethylendiaminu v deionizované vodě (obj./obj.)). Odečítají se optické hustoty při 540 nm za použití mikrodoskového spektrofotometru. Každá hodnota se stanovuje dvakrát. Jako standard pro kolorimetrickou metodu se použijí  $\text{KNO}_3$  a  $\text{NaNO}_2$ .

Při tomto testu oligosacharidy podle vynálezu inhibují více než 50 % tvorby  $\text{NO}_x$ .

Jakožto výhodné oligosacharidy obecného vzorce I lze zejména uvést oligosacharidy obecného vzorce I, ve kterém:

- n je rovno 0,  
     $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  
    M znamená sodík a  
    směs jeho diastereoisomerů;
- n je rovno 1,  
     $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  
     $R_4$  znamená atom vodíku a  
    M znamená sodík a  
    směs jeho diastereoisomerů;

- $n$  je rovno 2,  
 $R_1, R_2, R_3, R_5, R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  
 $R_4$  znamená atom vodíku a  
 $M$  znamená sodík a  
směs jeho diastereoisomerů;
- $n$  je rovno 2,  
 $R_1, R_2, R_3, R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  
 $R_5$  znamená atom vodíku nebo skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  
 $R_4$  znamená atom vodíku a  
 $M$  znamená sodík a  
směs jeho diastereoisomerů (derivát 1,6 anhydro  $\Delta\text{Is-Is-}$   
 $\text{-IIIs}$ ).

Následující příklady ilustrují přípravu oligosacharidů obecného vzorce I a příslušných meziproduktů.

V těchto příkladech mají následující zkratky tyto významy:

$\Delta\text{Is}$ : (kyselina 4-deoxy-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-threo-hex-enopyrano-syluronová) - (1 $\rightarrow$ 4) - 2-deoxy-2-sulfonamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosa, čtyřsodná sůl nebo také  $\Delta\text{UAp2S-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha$ -D-GlcNp2S6S;

$\text{Is}$ : (kyselina 2-sulldfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronová) - (1 $\rightarrow$ 4) - 2-deoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosa, čtyřsodná sůl nebo také  $\alpha$ -L-IdoAp2S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcNp2S6S;

$\text{IIIs}$ : (kyselina  $\alpha$ -L-idopyranosyluronová) - (1 $\rightarrow$ 4) - 2-deoxy-2-sulfoamido-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosa, trojsodná sůl nebo také  $\alpha$ -L-IdoAp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcNp2S6S;

IIIs: (kyselina 2-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfoamino- $\alpha$ -D-glukopyranosa, trojsodná sůl nebo také  $\alpha$ -L-IdoAp2S-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcNp2S;

IdoAp: kyselina isopyranosyluronová;

GlcNp: 2-deoxy-2-aminoglukopyranosa;

$\Delta$ Uap: kyselina 4-deoxy- $\alpha$ -L-threo-hex-enopyranosyluronová;

S: sulfát.

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad A

Příprava oligosacharidů obecného vzorce II, ve kterém n je rovno 0,1 a 2 enzymatickou depolymerací a separací.

25 g heparinu se rozpustí ve 250 ml roztoku fosfátového pufru obsahujícího 0,05 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH = 7), 0,2 mol/l chloridu sodného a 2 % bovinního sérového albuminu. Do této směsi se zavede 7 UI heparinázy I (EC 4.2.2.2.7) a získaný roztok se ochladí na teplotu 15 °C a potom se udržuje na této teplotě v průběhu celé depolymerační reakce. Průběh této reakce se sleduje odebíráním alikvotních vzorků reakční směsi a jejich permeační gelovou analýzou. Po devíti dnech se enzymatická reakce přeruší zahříváním reakční směsi na teplotu 100 °C po dobu dvou minut. Ochlazená reakční směs se potom lyofilizuje. Takto se získá směs oligosacharidů III.

Získaná směs oligosacharidů III se potom chromatografuje následujícím postupem.

Chromatografie se provádí v kolonách naplněných polyakrylamid-agarosovým gelem známým pod obchodním označením Ultrogel ACA 202 a uvedená směs se eluuje roztokem obsahujícím fosfátový pufr (0,02 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) s  $\text{pH} = 7$  a 0,1 mol/l chloridu sodného. Detekce se provádí ultrafialovou (254 nm) a iontovou (IBF) spektrometrií. Získané produkty mohou být případně přečistěny chromatografií SAX (strong anion exchange) nebo frakčním srážením provedeným postupem popsáním v patentovém dokumentu FR 2 548 672. Izolované produktové frakce se lyofilizují a potom odsolí v koloně naplněné gelem Sephadex  $\text{G10}^{\text{R}}$  (Pharmacia Biochemicals).

Uvedeným postupem se získají 3 g disacharidu Is, 1100 mg směsi hexasacharidu typicky obsahující 55 % derivátu  $\Delta\text{Is-Is-IIIs}$  a 10 %  $\Delta\text{Is-Is-IIIs}$ . Tato posledně uvedená směs může být buď přečistěna postupy, které jsou odborníkům známe, za účelem rozdělení všech složek směsi nebo použita jako taková pro převedení na 1,6-anhydro-derivát obecného vzorce I. Je třeba poznamenat, že v průběhu tohoto převedení hexasacharid  $\Delta\text{Is-Is-IIIs}$  nemůže vést k tvorbě sloučenin obecného vzorce I.

#### Příklad B

Příprava oligosacharidů obecného vzorce II, ve kterém n znamená 0, 1, 2, 3 nebo 4 depolymerací benzylesteru heparinu a separací

##### a) Příprava benzylesteru heparinu

Benzylester heparinu se připraví postupem popsáním v příkladu 3 patentu US 5,389,618.

## b) Depolymerace

100 g benzylesteru heparinu se rozpustí v 1,9 l demineralizované vody. Směs se zahřeje za míchání na teplotu 60 °C. Po získání homogenního roztoku se do tohoto roztoku zavede najednou asi 35 ml 23% roztoku hydroxidu sodného. Po 10 minutách se roztok ochladí a neutralizuje 80 ml asi 2N roztoku kyseliny octové. K tomuto roztoku se přidá 10 % (hmotn./obj.) octanu sodného. Směs oligosacharidů se vysráží přidáním asi 2 objemů methanolu. Sraženina se izoluje filtrací, dvakrát promyje methanolem a potom vysuší za sníženého tlaku při teplotě 50 °C. Po vysušení se získá 73,8 g směsi oligosacharidů II.

c) Obohacení oligosacharidem, ve kterém  $n = 1$ 

30 g výše uvedeným způsobem získané směsi oligosacharidů se rozpustí v asi 35 objemech vody. Tento roztok se podrobí ultrafiltraci přes membránu 3 kDa (Pellicon). Když se odtáhne 600 ml permeátu, tento permeát se zředí 500 ml vody. V operaci se pokračuje až do okamžiku, kdy se odtáhne dalších 450 ml dodatečného permeátu. Obě frakce permeátu se sloučí a potom zahustí k suchu za sníženého tlaku. Získá se 6,1 g nažloutle bílého produktu. Analýza tohoto pevného produktu provedená permeační gelovou chromatografií ukazuje, že tento produkt obsahuje asi 30 % oligosacharidu obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 1.

d) Frakcionace směsí oligosacharidů podrobených ultrafiltrací

Obohacená směs se frakcionuje v kolonách naplněných polyakrylamid-agarosovým gelem, který je znám pod označením Ultrogel ACA 202 (použijí se čtyři kolony v sérii, přičemž průměr kolon činí 10 cm a výška kolon činí 50 cm). 5 g směsi obohacené ultrafiltrací se rozpustí ve 25 ml vody a eluuje roztokem chloridu sodného o koncentraci 0,2 mol/l při průtoku 5 ml/min. Na spodku kolony se jímají 25 ml frakce eluátu. Detekce produktů se provede ultrafialovou (254 nm) a iontovou (IBF) spektrometrií. Frakce produktu, pro který  $n = 1$  se izolují, lyofilizují a potom odsolí v koloně naplněné gelem Sephadex G10. Po lyofilizaci se získá 1 g tetrasacharidu obsahujícího typicky 70 % derivátu  $\Delta\text{Is-Is}$  vzorce II ( $R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 = \text{SO}_3\text{Na}$  a  $M = \text{Na}$ ). Tento derivát  $\Delta\text{Is-Is}$  může být případně přečistěn chromatografií SAX (strong anion exchange) nebo výhodně frakčním srážením provedeným postupem popsáním v patentu FR 2 548 672.

#### Příklad 1

Do reaktoru udržovaného na teplotě 66 °C se zavede 5 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,0063 mol/l. Hodnota pH roztoku se potom změří a stanoví jako cílová hodnota (pH = 11,35). Za míchání se najednou přidá 30 mg oligosacharidu vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík. Hodnota pH se potom reguluje a udržuje na hodnotě pH = 11,35 kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 mol/l. Po deseti hodinách se přeruší přidávání hydroxidu sodného a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Hodnota pH roztoku se potom nastaví na hodnotu mezi 6 a 7 přidáním pryskyřice Amberlite IR120. Směs se zfiltruje přes membránu Whatman GF/B a potom zahustí za sníženého tlaku (2,7 kPa) při teplotě blízké 25 °C. Produkt se vyjme 0,5 ml

destilované vody a potom lyofilizuje. Takto se získá 29 mg směsi diastereoisomerů oligosacharidu vzorce I, ve kterém n je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $SO_3Na$  a M znamená sodík [kyselina 4-deoxy-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfoamino- $\beta$ -D-mannopyranóza, trojsodná sůl,

protonové spektrum ( $D_2O$ , 400 MHz, T=298K, delta v ppm):

3,15 (1H, s, H2),  
 3,75 (2H, m, H6 a H3),  
 3,88 (1H, m, H4),  
 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6),  
 4,22 (1H, t, J=5Hz, H3'),  
 4,58 (1H, m, H2'),  
 4,75 (1H, m, H5),  
 5,53 (1H, s, H1),  
 5,60 (1H, dd, J=6 a 1Hz, H1'),  
 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4');

kyselina 4-deoxy-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfoamido- $\beta$ -D-glukopyranóza, trojsodná sůl,

protonové spektrum ( $D_2O$ , 400 MHz, T=298K, delta v ppm):

3,34 (1H, dd, J=7 a 2Hz, H2),  
 3,72 (1H, t, J=8Hz, H6),  
 3,90 (1H, m, H3),  
 4,03 (1H, s, H4),  
 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6),  
 4,23 (1H, t, J=5Hz, H3'),  
 4,58 (1H, m, H2'),  
 4,78 (1H, m, H5),  
 5,50 (1H, s, H1),  
 5,60 (1H, dd, J=6 a 1Hz, H1'),  
 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4').

Příklad 2

Do reaktoru udržovaného na teplotě 62 °C se zavede 33,3 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,0063 mol/l. Hodnota pH roztoku se změří a stanoví se jako cílová hodnota (pH = 11,15). Za míchání se přidá najednou 200 mg oligosacharidu vzorce II, ve kterém n je rovno 1, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> znamenají skupinu SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> znamená atom vodíku a M znamená sodík. Hodnota pH se kontroluje a udržuje na hodnotě 11,15 kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 mol/l. Po 12 hodinách se přeruší přidávání hydroxidu sodného a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Hodnota pH roztoku se nastaví na hodnotu mezi 6 a 7 přidáním pryskyřice Amberlite IR120. Směs se zfiltruje přes membránu Whatman GF/B a potom zahustí k suchu za sníženého tlaku (2,7 kPa) při teplotě blízké 25 °C. Produkt se vyjme 3 ml destilované vody a potom lyofilizuje. Takto se získá 230 mg oligosacharidu vzorce I, ve kterém n je rovno 1, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> znamenají skupinu SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> znamená atom vodíku a M znamená sodík, ve formě směsi diastereomerů [kyselina 4-deoxy-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-kyselina 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-isopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfoamino- $\beta$ -D-mannopyranóza, heptasodná sůl:

protonové spektrum (D<sub>2</sub>O, 400 MHz, T=298K, delta v ppm):

3,15 (1H, s, H2),

3,25 (1H, m, H2"),

3,60 (1H, m, H3"),

mezi 3,70 a 4,70 (14H, blok, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4"/H5"/H6", H2'''/H3'''),

4,75 (1H, m, H5),

mezi 5,20 a 5,40 (2H, m, H1' a H1"),

5,45 (1H, m, H1'''),

5,56 (1H, m, H1),

5,94 (1H, d, J=5Hz, H4),

kyselina-4-deoxy-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-kyselina-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-isopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfoamido- $\beta$ -D-glukopyranóza, heptasodná sůl,

protonové spektrum (D<sub>2</sub>O, 400 MHz, T=298K, delta v ppm):

3,25 (1H,m,H2''),  
 3,42 (1H,dd,J=4 a 1Hz,H2),  
 3,60 (1H,m,H3''),  
 mezi 3,70 a 4,70 (14H,blok,H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5',H4''/-H5''/H6'', H2''''/H3'''),  
 4,75 (1H,m,H5,  
 mezi 5,20 a 5,40 (2H,m,H1' a H1''),  
 5,45 (1H,m,H1'''),  
 5,52 (1H,m,H1),  
 5,94 (1H,d,J=5Hz,H4)] .

### Příklad 3

Do reaktoru udržovaného na teplotě 62 °C se zavede 16,7 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,0063 mol/l. Změří se hodnota pH roztoku a tato hodnota se stanoví jako cílová hodnota pH (pH = 11,7). Za míchání se přidá najednou 100 mg oligosacharidu vzorce II, ve kterém n je rovno 2, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> a R<sub>6</sub> znamenají skupinu SO<sub>3</sub>Na, R<sub>4</sub> znamená atom vodíku a M znamená sodík. Hodnota pH se kontroluje a udržuje na hodnotě 11,7 kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 mol/l. Po 10 hodinách se přeruší přidávání hydroxidu sodného a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Hodnota pH roztoku se potom nastaví na hodnotu mezi 6 a 7 přidáním pryskyřice Amberlite IR120. Směs se zfiltruje přes membránu Whatman GF/B, načež se zahustí k suchu za sníženého tlaku (2,7 kPa) při teplotě

blízké 25 °C. Produkt se vyjme 3 ml destilované vody a potom lyofilizuje. Takto se získá 108 mg oligosacharidu obecného vzorce I, ve kterém n je rovno 2,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $R_4$  znamená atom vodíku a M znamená sodík, ve formě směsi diastereoizomerů; jako A až F se označují konstituční cukry hexasacharidů, přičemž A znamená zbytek 1,6-anhydro a F znamená zbytek nenasycené kyseliny uronové [kyselina 4-deoxy-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-kyselina 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-kyselina 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-isopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-deoxy-2-sulfoamino- $\beta$ -D-mannopyranóza, undekasodná sůl,

protonové spektrum ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz, T=298K, delta v ppm):

3,15 (1H, s, H2 (A)),

3,25 (2H, m, H2 (C+E)),

3,60 (2H, m, H3 (C+E)),

mezi 3,65 a 4,50 (19H, blok, H2 (B+D) / H3 (A+B+D+F) / H4 (A+B+C+D+E) / H5 (C+E) / H6 (A+C+E)),

4,60 (1H, s, H2 (F)),

4,80 (3H, m, H5 (A+B+D)),

5,18 (1H, s, H1 (D)),

5,30 (1H, s, H1 (B)),

5,34 (1H, d, H1 (C)),

5,36 (1H, d, H1 (E)),

5,46 (1H, s, H1 (F)),

5,57 (1H, s, H1 (A)),

5,95 (1H, d, J=5Hz, H4 (F));

kyselina

4-deoxy-2-O-sulfo- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-kyselina 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-isopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-kyselina 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronová-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhy-

dro-2-deoxy-2-sulfoamino- $\beta$ -D-glukopyranóza, udekansodná  
sůl,

protonové spektrum ( $D_2O$ , 600 MHz,  $T=298K$ , delta v ppm):

3,25 (2H, m, H2 (C+E)),  
3,42 (1H, m, H2 (A)),  
3,60 (2H, m, H3 (C+E)),  
mezi 3,65 a 4,50 (19H, blok, H2 (B+D) / H3 (A+B+D+F) / H4 (A+B+C+D+  
E) / H5 (C+E) / H6 (A+C+E)),  
4,60 (1H, s, H2 (F)),  
4,80 (3H, m, H5 (A+B+D)),  
5,18 (1H, s, H1 (D)),  
5,31 (1H, s, H1 (B)),  
5,34 (1H, d, H1 (C)),  
5,36 (1H, d, H1 (E)),  
5,46 (1H, s, H1 (F)),  
5,52 (1H, s, H1 (A)),  
5,95 (1H, d,  $J=5Hz$ , H4 (F))].

#### Příklad 4

Do reaktoru udržovaného na teplotě 62 °C se zavedou 4 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,0316 mol/l. Změří se hodnota roztoku a tato hodnota se stanoví jako cílová hodnota pH ( $pH = 11,8$ ). Za míchání se najednou přidá 100,8 mg směsi oligosacharidů vzorce II, ve kterém n je rovno 2, obsahující 55 % derivátu  $\Delta Is-Is-Is$  ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $SO_3Na$ ,  $R_4$  znamená atom vodíku a M znamená sodík), 35 % derivátu  $\Delta Is-Is-IIIs$  ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $SO_3Na$ ,  $R_5$  znamená buď skupinu  $SO_3Na$  nebo atom kyslíku,  $R_4$  znamená atom vodíku a M znamená sodík) a 10 % derivátu  $\Delta Is-Is-IIIs$  ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $SO_3Na$ ,  $R_4$  znamená atom vodíku a M znamená sodík, přičemž skupina  $SO_3M$  uhlíku C6 je nahrazena atomem vodíku).

Hodnota pH se kontroluje a udržuje na hodnotě 11,8 kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 0,5 mol/l. Po 11 hodinách se přeruší přidávání hydroxidu sodného a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Hodnota pH roztoku se nastaví na 6 až 7 přidáním pryskyřice Amberlite IR120. Směs se zfiltruje přes membránu Whatman GF/B a potom zahustí k suchu za sníženého tlaku (2,7 kPa) při teplotě blízké 25 °C. Produkt se vyjme 1,5 ml destilované vody a potom lyofilizuje. Takto se získá 110 mg směsi oligosacharidů obecného vzorce I, ve kterém  $n$  je rovno 2, obsahující zejména derivát 1,6-anhydro- $\Delta$ Is-Is-Is ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_5$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $R_4$  znamená atom vodíku a  $M$  znamená sodík) a derivát 1,6-anhydro- $\Delta$ Is-Is-IIIs ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $R_5$  znamená buď skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  nebo atom vodíku,  $R_4$  znamená atom vodíku a  $M$  znamená sodík). Analýza provedená vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií v modu iontových párů umožňuje sledovat transformaci na derivát obecného vzorce I. V tomto případě vysoce výkonná kapalinová chromatografie ukazuje, že proběhla transformace v případě derivátů  $\Delta$ Is-Is-Is,  $\Delta$ Is-Is-IIIs.

#### Příklad 5

Do reaktoru udržovaného na teplotě 66 °C se zavede 8,6 ml roztoku hydroxidu lithného o koncentraci 0,025 mol/l. změří se hodnota pH a tato se stanoví jako cílová hodnota (pH = 11,68). Za míchání se potom najednou přidá 50 mg oligosacharidu obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík. Hodnota pH se kontroluje a udržuje na 11,68 kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu lithného o koncentraci 0,466 mol/l. Po 8 hodinách se přidávání roztoku hydroxidu lithného přeruší a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Analýza provedená

vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií v modu párových iontů umožňuje sledovat transformaci na derivát obecného vzorce I, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík nebo lithium. V tomto případě, vysoce výkonná kapalinová chromatografie ukazuje, že uvedená transformace proběhla na 100 %. Výtěžek stanovený za použití vnějšího standardu činí 81,2 %.

#### Příklad 6

Do reaktoru udržovaného na teplotě 66 °C se zavede 8,3 ml roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 0,0063 mol/l. změří se hodnota pH a tato se stanoví jako cílová hodnota (pH = 11,1). Za míchání se potom najednou přidá 50 mg oligosacharidu obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík. Hodnota pH se kontroluje a udržuje na 11,1 kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 0,515 mol/l. Po 24 hodinách se přidávání roztoku hydroxidu draselného přeruší a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Analýza provedená vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií v modu párových iontů umožňuje sledovat transformaci na derivát obecného vzorce I, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík nebo draslík. V tomto případě, vysoce výkonná kapalinová chromatografie ukazuje, že uvedená transformace proběhla na 100 %. Výtěžek stanovený za použití vnějšího standardu činí 75,6 %.

#### Příklad 7

Do reaktoru udržovaného na teplotě 66 °C se zavede 8,3 ml roztoku hydroxidu cesného o koncentraci 0,0063 mol/l.

změří se hodnota pH a tato se stanoví jako cílová hodnota ( $\text{pH} = 10,75$ ). Za míchání se potom najednou přidá 50 mg oligosacharidu obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík. Hodnota pH se kontroluje a udržuje na 10,75 kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu cesného o koncentraci 0,476 mol/l. Po 20 hodinách se přidávání roztoku hydroxidu cesného přeruší a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Analýza provedená vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií v modu párových iontů umožňuje sledovat transformaci na derivát obecného vzorce I, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík nebo cesium. V tomto případě, vysoce výkonná kapalinová chromatografie ukazuje, že uvedená transformace proběhla na 90,3 %. Výtěžek stanovený za použití vnějšího standardu činí 73 %.

#### Příklad 8

Do reaktoru udržovaného na teplotě 66 °C se zavede 8,3 ml roztoku tetrabutylamoniumhydroxidu o koncentraci 0,0063 mol/l. změří se hodnota pH a tato se stanoví jako cílová hodnota ( $\text{pH} = 10,95$ ). Za míchání se potom najednou přidá 50 mg oligosacharidu obecného vzorce II, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík. Hodnota pH se kontroluje a udržuje na 10,95 kontinuálním přidáváním roztoku tetrabutylamoniumhydroxidu o koncentraci 0,521 mol/l. Po 16 hodinách se přidávání roztoku tetrabutylamoniumhydroxidu přeruší a reakční směs se ochladí na teplotu 25 °C. Analýza provedená vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií v modu párových iontů umožňuje sledovat transformaci na derivát obecného vzorce I, ve kterém  $n$  je rovno 0,  $R_1$  a  $R_6$  znamenají skupinu  $\text{SO}_3\text{Na}$  a  $M$  znamená sodík nebo tetrabutylamonium. V tomto případě, vysoce výkonná kapalinová chromatografie ukazuje, že

uvedená transformace proběhla na 96,7 %. Výtěžek stanovený za použití vnějšího standardu činí 65 %.

Léčiva podle vynálezu obsahují jako účinnou látku alespoň jeden oligosacharid obecného vzorce I nebo směs oligosacharidů obecného vzorce I ve formě kompozice, ve které jsou uvedený oligosacharid nebo uvedená směs oligosacharidů obsaženy v kombinaci s libovolným jiným farmaceuticky kompatibilním produktem, který může být inertní nebo fyziologicky účinný. Léčiva podle vynálezu mohou být aplikována intravenózním, subkutánním, orálním, rektálním, topickým nebo inhalačním podáním.

Sterilními kompozicemi pro intravenózní nebo subkutánní podání jsou obecně vodné roztoky. Tyto kompozice mohou rovněž obsahovat přísady, zejména smáčecí činidla, izotonizující činidla, emulgační činidla, dispergační činidla a stabilizační činidla. Sterilizace kompozic může být provedena několika způsoby, například sterilizující filtrací, ozářením nebo přidáním sterilizačních činidel ke kompozici. Uvedené kompozice mohou být rovněž připraveny ve formě pevných kompozic, které mohou být rozpuštěny bezprostředně před použitím ve sterilní vodě nebo v libovolném jiném sterilním injikovatelném prostředí.

Jako pevné kompozice pro orální podání mohou být použity tablety, pilulky, prášky (želatinové kapsle, sáčky) nebo granule. V těchto kompozicích je účinná látka smíšena pod proudem argonu s jedním nebo několika inertními ředidly, jakým jsou škrob, celulóza, sacharóza, laktóza nebo silika. Tyto kompozice mohou rovněž obsahovat látky jiné než ředidla, a to například jedno nebo několik maziv, jakými jsou zejména stearát hořečnatý nebo talek, činidlo

podporující orální absorpci, barvivo, zapouzďovací materiál (dražé) nebo lak.

Jako kapalné kompozice pro orální podání mohou být použity farmaceuticky přijatelné roztoky, suspenze, emulze, sirupy a elixíry obsahující inertní ředidla, jakými jsou zejména voda, ethanol, glycerol, rostlinné oleje nebo parafinový olej. Tyto kompozice mohou obsahovat i jiné látky než ředidla, a to například smáčedla, sladidla, zhutňovadla, aromatizační látky nebo stabilizátory.

Kompozicemi pro rektální podání jsou čípky nebo rektální kapsle, které vedle účinné látky obsahují pomocné látky, jakými jsou kakaové máslo, polosyntetické glyceridy nebo polyethylenglykoly.

Kompozicemi pro topické podání mohou být například krémy, lotiony, náplasti, kolutoria, nosní kapky nebo aerosoly.

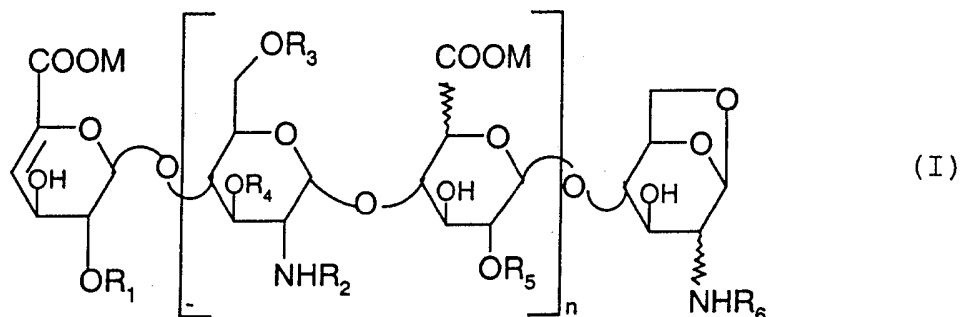
Dávky účinných látek podle vynálezu závisí na požadovaném účinku, na době léčení a na zvoleném způsobu podání; tyto dávky se obecně pohybují mezi 0,5 a 10 mg na kilogram tělesné hmotnosti pacienta a den při subkutánním podání, t.j. 3 až 60 mg denně pro dospělého pacienta s tělesnou hmotností 60 kg.

Vhodné dávkování obecně stanoví ošetřující lékař v závislosti na věku, tělesné hmotnosti a ostatních individuálních faktorech pacienta.

Vynález se rovněž týká způsobu prevence nebo léčení nemocí spojených se zánětlivým procesem zahrnujícím produkci cytotoxických látek, mezi které patří zejména oxid dusnatý (NO). Oligosacharidy obecného vzorce I mohou být takto použity pro prevenci nebo/a léčení neurodegenerativních chorob, při kterých cerebrální zánět hraje zhoubnou úlohu, které mohou vést ke smrti a ze kterých lze uvést ischemie centrální nervové soustavy, mozkové ischemie, ischemie sítnice a kochlei, srdeční ischemie (infarkt myokardu), periferní ischemie, poruchy centrální nervové soustavy a zejména úrazy lebky, páteře a kombinované úrazy lebky a páteře, poškození sítnice a kochlei, roztroušenou sklerózu, neuropatické bolesti a periferní neuropathie, nemoci motoneuronu a z nich amyotrofni laterální sklerózu, neuro-AIDS, Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, Huntigtonovu choreu a některé formy osteoartritidy, zejména v úrovni kloubů.

## P A T E N T O V É      N Á R O K Y

## 1. Oligosacharidy obecného vzorce I



ve kterém  $n$  znamená celé číslo 0 až 25,  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  a  $R_5$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo skupinu  $SO_3M$ ,  $R_2$  a  $R_6$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo skupinu  $SO_3M$  nebo skupinu  $COCH_3$  a  $M$  znamená sodík, vápník, hořčík nebo draslík, směs těchto oligosacharidů a jejich diastereoizomery.

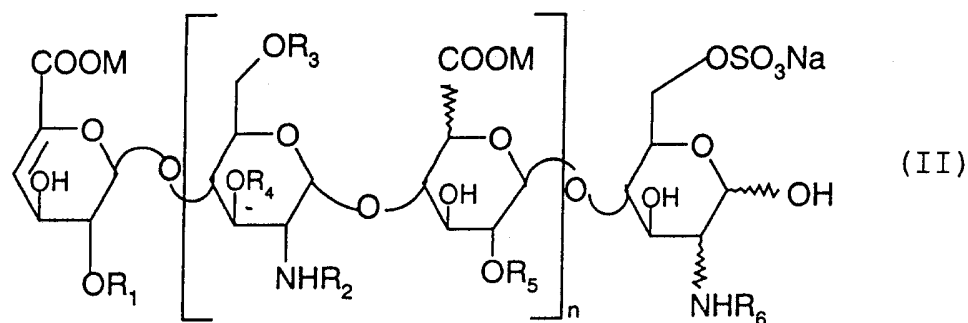
2. Oligosacharidy podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém  $R_4$  znamená atom vodíku, směs těchto oligosacharidů a jejich diastereoizomery.

3. Oligosacharidy podle některého z nároků 1 nebo 2, obecného vzorce I, ve kterém  $n$  znamená celé číslo 0 až 10, směs těchto oligosacharidů a jejich diastereoizomery.

4. Oligosacharidy podle některého z nároků 1 nebo 2 obecného vzorce I, ve kterém  $n$  znamená celé číslo 0 až 6, směs těchto oligosacharidů a jejich diastereoizomery.

5. Oligosacharidy podle některého z nároků 1 nebo 2 obecného vzorce I, ve kterém  $n$  znamená celé číslo 1 až 6, směs těchto oligosacharidů a jejich diastereoizomery.

6. Způsob přípravy oligosacharidů obecného vzorce I podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že se působí hydroxidem alkalického kovu nebo kvartérním amoniumhydroxidem na oligosacharidy obecného vzorce II



ve kterém  $n$  znamená celé číslo 0 až 25,  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  a  $R_5$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo skupinu  $\text{SO}_3\text{M}$ ,  $R_2$  a  $R_6$ , které jsou stejné nebo odlišné, znamenají atom vodíku nebo skupinu  $\text{SO}_3\text{M}$  nebo  $\text{COCH}_3$  a  $\text{M}$  znamená sodík, vápník, hořčík nebo draslík, nebo na jejich směs, načež se získané oligosacharidy nebo jejich směsi izolují.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č e n ý t í m, že se reakce provede ve vodném prostředí při teplotě 40 až 80 °C a hodnotě pH 10 až 13.

8. Způsob podle některého z nároků 6 nebo 7, v y z n a - č e n ý t í m, že se použije 1 až 5% vodný roztok hydroxidu alkalického kovu nebo kvartérního amoniumhydroxidu.

9. Způsob podle některého z nároků 6 až 8, v y z n a -  
č e n ý t í m, že se reakce provádí při teplotě 60 až 70  
°C.

10. Způsob podle nároků 6 až 9, v y z n a č e n ý t í m,  
že reakční hodnota pH je rovna 11 až 12,5.

11. Způsob podle nároků 6 až 10, v y z n a č e n ý t í m,  
že hydroxidem alkalického kovu nebo kvartérním  
amoniumhydroxidem je hydroxid sodný, hydroxid draselný,  
hydroxid lithný, hydroxid cesný nebo tetrabutylamoniumhy-  
droxid.

12. Farmaceutická kompozice, v y z n a č e n á t í m, že  
jako účinnou látku obsahuje alespoň jeden oligosacharid  
podle nároku 1.

13. Farmaceutická kompozice, v y z n a č e n á t í m, že  
jako účinnou látku obsahuje alespoň jeden oligosacharid  
podle některého z nároků 1 až 5.

14. Použití oligosacharidů obecného vzorce I podle  
některého z nároků 1 až 5 pro přípravu léčiva určeného pro  
prevenci nebo léčení nemocí spojených se zánětlivým  
procesem zahrnujícím produkci oxidu dusnatého (NO).

15. Použití oligosacharidů obecného vzorce I podle nároku  
14 pro přípravu léčiva určeného pro prevenci a léčení  
cerebrálních, srdečních nebo vaskulárních periferních  
ischemií, osteoartritid, poranění centrální nervové

soustavy, poranění lebky, poranění páteře a kombinovaného poranění lebky a páteře, roztroušené sklerózy, neuropatických bolestí, periferních neuropatií, nemocí motoneuronu, amyotrofní laterální sklerózy, neuro-AIDS, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby a Huntingtonovy chorei.

Zastupuje: