

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201991615 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.12.30(22) Дата подачи заявки  
2017.12.27

(51) Int. Cl. *A61K 31/7016* (2006.01)  
*A61K 31/702* (2006.01)  
*A61K 31/734* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)  
*C08B 37/04* (2006.01)  
*C07H 3/04* (2006.01)  
*C07H 3/06* (2006.01)  
*C07H 1/00* (2006.01)

## (54) КОМПОЗИЦИЯ МАННУРОНОВОЙ ДИКИСЛОТЫ

(31) PCT/CN2016/113879

(32) 2016.12.30

(33) CN

(86) PCT/CN2017/118843

(87) WO 2018/121559 2018.07.05

(71) Заявитель:

ШАНХАЙ ГРИН ВЭЛИ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.;  
ШАНГХАЙ ИНСТИТУТ ОФ  
МАТИРИА МЕДИКА, ЧАЙНИЗ  
АКЭДЕМИ ОФ САЙНСИЗ (CN)

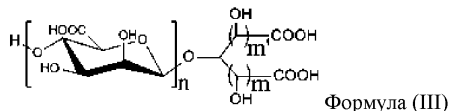
(72) Изобретатель:

Гэн Мэйюй, Дин Цзянь, Чжан  
Чжэньцин, Сяо Чжунпин, Ду Сяогуан,  
Синь Сяньлянь (CN)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение касается композиции олигосахаридных маннурановых дикислот, содержащей маннурановую дикислоту, имеющую формулу (III), или ее фармацевтически приемлемую соль, где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 9,  $m$  равно 0, 1 или 2 и  $m'$  равно 0 или 1 и где общая масса маннурановых дикислот, у которых  $n=1-5$ , составляет 80-95% от общей массы композиции и соотношение общей массы маннурановых дикислот, у которых  $n=1-3$ , к общей массе маннурановых дикислот, у которых  $n=4-7$ , составляет от 1,0 до 3,5.



A1

201991615

201991615

A1

## КОМПОЗИЦИЯ МАННУРОНОВОЙ ДИКИСЛОТЫ

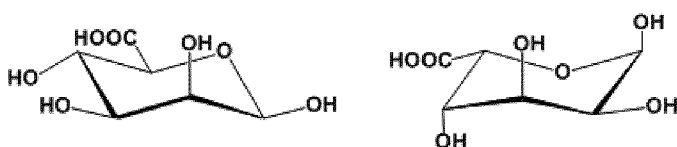
Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается оптимальной композиции маннуроновых дикислот, полученной методом скрининга биологической активности, в котором применяется животная модель старческого слабоумия для оценки влияния различных степеней полимеризации и пропорций маннуроновых дикислот на их биологическую активность. Наконец, была протестирована композиция с наилучшей биологической активностью, и целевое вещество было получено с помощью разделения на ультрафильтрующей мембране.

Предпосылки создания изобретения

Маннуроновым дикислотам уделялось большое внимание по причине их потенциальной ценности для медицинского применения. Маннуроновые дикислоты обычно получают многостадийным методом, используя альгиновую кислоту в качестве исходного соединения.

Полисахаридная молекула исходного соединения, альгиновой кислоты, содержит М-сегмент, образованный из D-маннуроновых кислот, связанных  $\beta$ -1,4-гликозидными связями, G-сегмент, образованный из L-гулуруновых кислот, связанных  $\alpha$ -1,4-гликозидными связями, и гибридный MG-сегмент, образованный двумя сахарами. Структурные формулы маннуроновой кислоты и гулуруновой кислоты показаны ниже на Формуле (I):



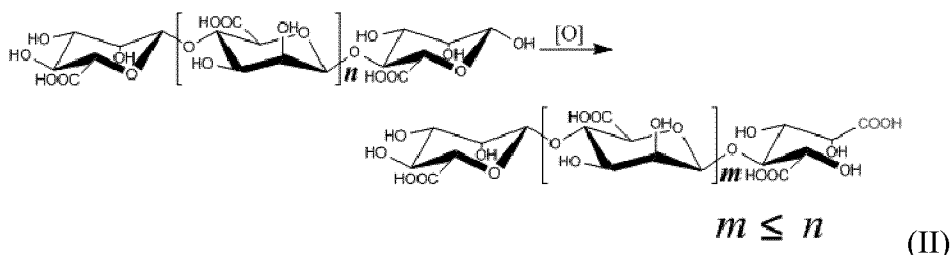
М:  $\beta$ -D- маннуроновая кислота G:  $\alpha$ -L - гулуруновая кислота (I)

М- и G-сегменты можно отделить от исходного соединения, альгиновой кислоты. Общий метод может быть вкратце описан так: альгиновую кислоту предварительно разлагают, получая полисахаридную смесь полиманнуроновой кислоты и полигулуруновой кислоты; полученную полисахаридную смесь подвергают кислотному осаждению для удаления из смеси полигулуруновой кислоты; далее проводят очистку для получения гомополиманнуроновой кислоты, имеющей чистоту 90% или выше (далее в тексте именуется "М-сегментный интермедиат"). В этой связи можно обратиться, например, к методам, описанным в заявке на патент Китая № 98806637.8 и CN02823707.2.

Олигоманнуроновую кислоту можно получать следующим образом: М-сегментный интермедиат, полученный как описано выше, подвергают дальнейшему ацидолизу

посредством нагревания в кислотных условиях, с образованием маленького фрагмента полимера маннуроновой кислоты, имеющего желаемый диапазон молекулярной массы. Кроме того, эффективность разложения можно повысить с помощью метода окислительного разложения; восстанавливающий конец можно окислить до сахарной кислоты с открытой цепью, см. заявку на патент Китая 200580009396.5 (Патентный документ 1), поданную Meiyu Geng, et al., и Патент США № 8,835,403 В2 (Патентный документ 2). Для удобства, Патентные документы 1 и 2 далее по тексту совместно именуется более ранними патентами, которые в полном объеме включены в настоящий текст посредством ссылки.

Процесс получения маннуроновой дикислоты, описанный в более ранних патентах, можно представить уравнением реакции (II), а именно: альдегидную группу в положении C1 маннуроновой кислоты на восстанавливающем конце полисахарида олигоманнуроновой кислоты окисляют до карбоксильной группы.



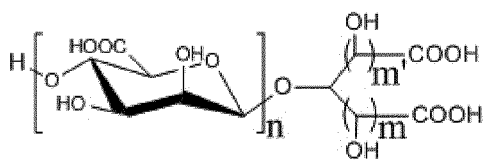
В изображенном выше процессе окислительной конверсии, обычно в качестве окислителя используется щелочной раствор сульфата меди, т.е. реактив Фелинга. В более ранних патентах просто адаптируется этот метод окисления. Более конкретно, в щелочных условиях субстрат – полиманнуроновую кислоту, т.е. описанный выше М-сегментный интермедиат – добавляют в раствор сульфата меди и ведут реакцию на кипящей водяной бане от 15 минут до 2 часов. В этом способе в качестве окислителя для окисления альдегидной группы используют ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , и в ходе реакции образуется кирпично-красный осадок оксида меди. Эта реакция часто применяется для идентификации восстанавливающих сахаров.

В более ранних патентах описано, что олигоманнуровые кислоты эффективны против болезни Альцгеймера и сахарного диабета. Патогенез болезни Альцгеймера и диабета 2-го типа тесно связан с амилоидами ( $\beta$ -амилоид и амилин). Амилоиды могут агрегироваться с образованием белковых олигомеров, а при дальнейшей агрегации формируются волокна. Эти белковые агрегаты цитотоксичны, могут вызывать окислительную реакцию в клетках с повреждением митохондрий, а также могут запускать каскадную реакцию, такую как воспалительный ответ, вызывая повреждение большого числа нейронов и бета-клеток, что в итоге приводит к возникновению болезни

Альцгеймера и диабета 2-го типа. Олигоманнуровые кислоты воздействуют на амилоиды и антагонизируют каскадные реакции, вызываемые амилоидами, и поэтому оказывают профилактическое и лечебное действие против болезни Альцгеймера и диабета 2-го типа.

#### Краткое описание изобретения

Первый аспект настоящего изобретения касается композиции олигосахаридных маннуриновых дикислот, содержащей маннуриновую дикислоту, имеющую Формулу (III), или ее фармацевтически приемлемую соль:



Формула (III)

где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 9,  $m$  равно 0, 1 или 2, и  $m'$  равно 0 или 1,

и где

общий вес маннуриновых дикислот, в которых  $n = 1-5$ , составляет 80-95% от общего веса композиции, и

соотношение общего веса маннуриновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , к общему весу маннуриновых дикислот, у которых  $n = 4-7$ , составляет от 1,0 до 3,5.

В другом аспекте настоящего изобретения описана фармацевтическая композиция или продукт для ухода за здоровьем, содержащий композицию олигосахаридных маннуриновых дикислот по настоящему изобретению и, при необходимости, подходящий носитель.

В другом аспекте настоящего изобретения описан способ лечения пациента со старческим слабоумием, включающий введение эффективного количества композиции олигосахаридных маннуриновых дикислот по настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в этом.

Композицию олигосахаридных маннуриновых дикислот по настоящему изобретению получают способом, отличающимся от ранее описанных в уровне техники. Этот способ получения имеет преимущества, заключающиеся в простоте реакции, высоком содержании активного ингредиента и отсутствии остаточных количеств исходных реагентов. Было экспериментально продемонстрировано, что композиция олигосахаридных маннуриновых дикислот по настоящему изобретению может ингибировать повреждение клеток, защищать нервные клетки и повышать выживаемость клеток. В животной модели композиция олигосахаридных маннуриновых дикислот по настоящему изобретению способна значительно улучшать обучаемость и когнитивные функции у крыс, страдающих слабоумием. Композиция олигосахаридных маннуриновых

дикислот по настоящему изобретению обладает потенциальной эффективностью в профилактике и лечении болезни Альцгеймера.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны масс-спектры дисахарида, трисахарида и тетрасахарида в продукте А.

На фиг. 2 показаны масс-спектры пентасахарида, гексасахарида и гептасахарида в продукте А.

На фиг. 3 показаны масс-спектры октасахарида, нонасахарида и декасахарида в продукте А.

Фиг. 4 иллюстрирует защитный эффект продукта А в различных концентрациях на Аβ-индуцированное повреждение нервных клеток.

Фиг. 5 иллюстрирует защитный эффект олигоманнуровой кислоты, имеющей единственную степень полимеризации, на Аβ-индуцированное повреждение нервных клеток.

Фиг. 6 иллюстрирует оценку эффекта олигомеров от дисахарида до декасахарида в животной модели болезни Альцгеймера.

Фиг. 7 иллюстрирует влияние олигосахаридных композиций и гексасахарида на число пересечений платформы животными с болезнью Альцгеймера.

Фиг. 8 иллюстрирует влияние олигосахаридных композиций и гексасахарида на дистанцию, проплываемую животными с болезнью Альцгеймера.

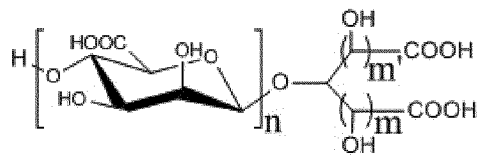
На фиг. 9 показана активность олигомеров от дисахарида до декасахарида и композиции А в модели клеточной со-культуры.

Подробное описание изобретения

Ниже будут описаны различные аспекты настоящего изобретения. Однако, настоящее изобретение не ограничивается только указанными частными вариантами осуществления. Квалифицированный специалист в данной области может сделать некоторые модификации в настоящем изобретении в свете приведенного ниже полного описания, и такие модификации также входят в объем настоящего изобретения.

Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот

Первый аспект настоящего изобретения относится к композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот, содержащей маннуроновую дикислоту, имеющую Формулу (III), или ее фармацевтически приемлемую соль:



Формула (III)

где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 9,  $m$  равно 0, 1 или 2, и  $m'$  равно 0 или 1,

и где

общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-5$ , составляет 80-95% от общей массы композиции, и соотношение общей массы маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , к общей массе маннуроновых дикислот, у которых  $n = 4-7$ , составляет от 1,0 до 3,5.

Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению представляет собой смесь маннуроновых дикислот с разной степенью полимеризации, и ее главными компонентами являются олигосахаридные маннуроновые дикислоты со степенью полимеризации от 2 до 10. Согласно более ранним заявкам наиболее активными сахарами в маннуроновых дикислотах являются соединения от пентасахаридов до октасахаридов, в частности гексасахарид. Однако, в отличие от предшествующего уровня техники, авторы настоящего изобретения обнаружили, что добавление менее активных соединений – от дисахарида до тетрасахарида – к наиболее активным соединениям – от пентасахарида до октасахарида – дает биологическую активность выше, чем у соединений от пентасахарида до октасахарида, в условиях разбавления концентраций высокоактивных сахаридов.

В предпочтительном варианте осуществления в композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $m + m' = 1$  или 2, составляет не меньше 50%, предпочтительно 60-90%, более предпочтительно 70-90% от общей массы композиции. В частности, в композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $m + m' = 1$ , составляет не меньше 10%, предпочтительно 30-40% от общей массы композиции. В другом предпочтительном варианте осуществления в композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $m + m' = 2$ , составляет не меньше 10%, предпочтительно 30-50% от общей массы композиции.

В предпочтительном варианте осуществления в композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению общая масса олигосахаридных маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-5$ , составляет 80-95% от общей массы композиции.

В предпочтительном варианте осуществления в композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению общая масса олигосахаридных маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , составляет 20-70% от общей массы

композиции.

В предпочтительном варианте осуществления в композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению соотношение общей массы маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , к общей массе олигосахаридных маннуроновых дикислот, у которых  $n = 4-7$ , составляет от 1,0 до 3,5, предпочтительно от 1,0 до 3,0.

В предпочтительном варианте осуществления в композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению массовые проценты олигосахаридных маннуроновых дикислот с разной степенью полимеризации в композиции составляют: 5-25% дисахарида, 15-30% трисахарида, 15-25% тетрасахарида, 10-25% пентасахарида, 5-15% гексасахарида, 3-10% гептасахарида, 2-5% октасахарида, 1-5% нонасахарида и 1-5% декасахарида. В частности, массовые проценты олигосахаридов в композиции составляют: 10-20% дисахарида, 18-30% трисахарида, 15-25% тетрасахарида, 15-20% пентасахарида, 5-10% гексасахарида, 3-5% гептасахарида, 2-3% октасахарида, 1-3% нонасахарида и 1-3% декасахарида.

В композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по настоящему изобретению фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль или калиевую соль.

Способ получения композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот

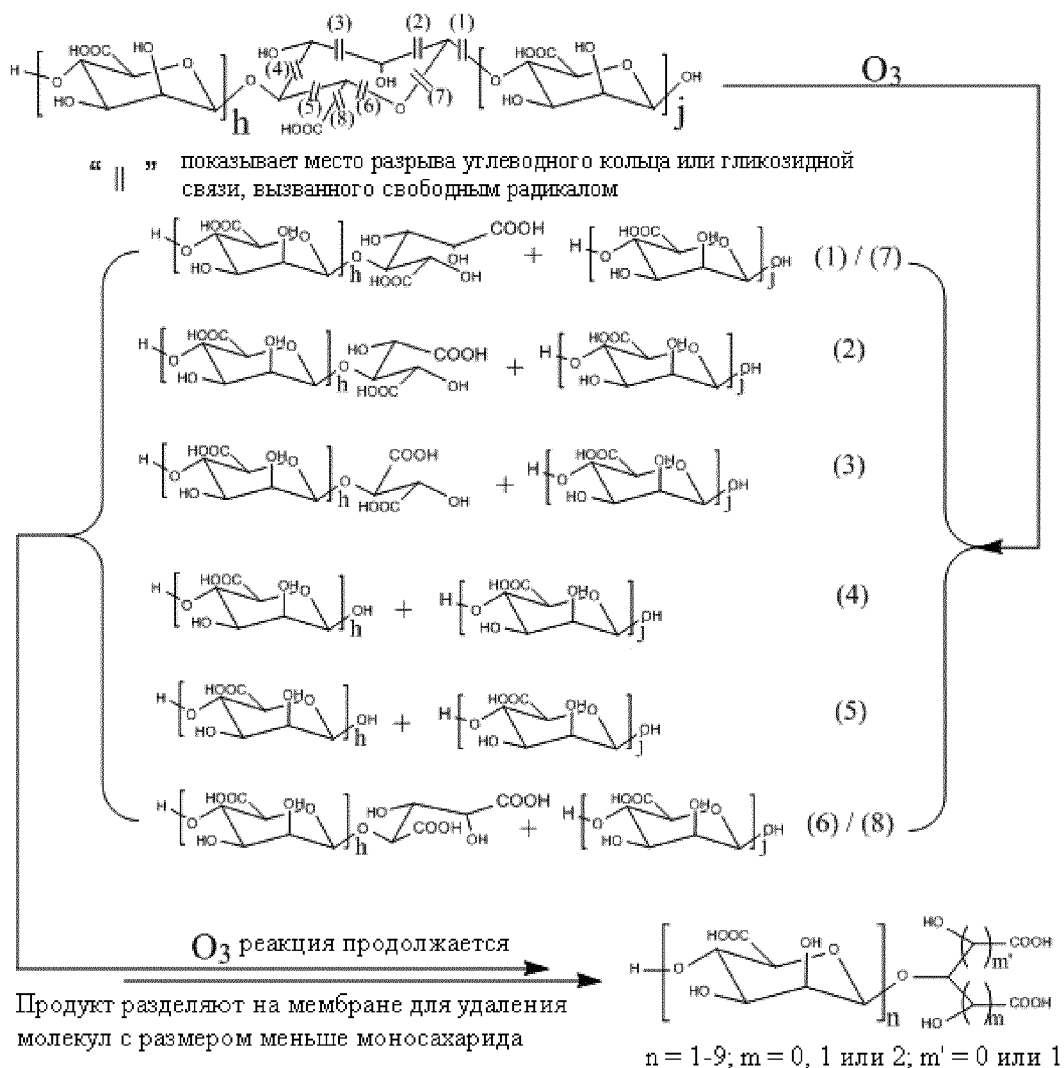
Способ получения маннуроновой дикислоты по настоящему изобретению описан ниже.

Описанный выше М-сегментный интермедиат окислительно расщепляют по сахарной цепочке в присутствии окислителя, получая окисленные олигосахариды с различными степенями полимеризации. Окисленные олигосахариды отличаются тем, что маннуроновые кислоты на восстанавливаемом конце олигосахаридов окислены до сахарных кислот, содержащих 3-6 атомов углерода.

Особенно предпочтительным окислителем для реакции по настоящему изобретению является озон. Во время реакции происходит окислительное расщепление сахарной цепочки, когда озон вводят в раствор, содержащий М-сегментный интермедиат. Температура, при которой проводят стадию окислительного расщепления, предпочтительно составляет 0-70°C, более предпочтительно 10-45°C. Значение рН, при котором проводят описанную выше стадию окислительного расщепления, составляет 3-13, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 6-8.

Реакция окислительного расщепления с применением озона в настоящем изобретении и окислительное расщепление с применением щелочного сульфата меди

(более ранние патенты) или кислотный гидролиз в присутствии пероксида водорода и гипохлорита натрия (заявка на патент Китая № 01107952.5) в уровне техники – все они вызывают расщепление сахарной цепочки, но структуры на восстанавливающих концах сахарных цепочек продуктов расщепления различаются: продукт окислительного расщепления, полученный по настоящему изобретению, маннуриновая дикислота, имеет дикислотную структуру с 3-6 атомами углерода на восстанавливаемом конце. Кроме того, способ, применяющийся на стадии окислительного расщепления по настоящему изобретению, обеспечивает также другие преимущества: 1) условия реакции мягкие и не требуется использовать специальные условия для проведения реакции; 2) используемый озон можно получать *in situ*, и поэтому при промышленном производстве меньше затраты на транспортировку; и 3) после реакции озон автоматически разрушается до кислорода, и поэтому отсутствует вред от остаточных количеств реагентов или загрязнение окружающей среды. Реакция изображена ниже на уравнении (IV):



В схематической диаграмме в приведенном выше уравнении (IV) и в соединении, имеющем Формулу (III),



олигосахарид, в котором  $m = 2$  и  $m' = 1$ , представляет собой сахарную кислоту, содержащую 6 атомов углерода;

олигосахарид, в котором  $m = 1$  и  $m' = 1$  или ( $m = 2$  и  $m' = 0$ ), представляет собой сахарную кислоту, содержащую 5 атомов углерода;

олигосахарид, в котором  $m = 1$  и  $m' = 0$  или ( $m = 0$  и  $m' = 1$ ), представляет собой сахарную кислоту, содержащую 4 атома углерода; и

олигосахарид, в котором  $m = 0$  и  $m' = 0$ , представляет собой сахарную кислоту, содержащую 3 атома углерода.

Полученный как описано выше продукт реакции обессоливают методом мембранного разделения, получая продукт А, как определяют путем верификации структуры методом LC-MS и измерения соотношения олигосахаридов. Соотношение олигосахаридов определяют методом эксклюзионной хроматографии на молекулярных ситах в комбинации с многоугловым лазерным светорассеянием. Затем продукт А разделяют методом колоночной хроматографии, получая олигосахариды с одной определенной степенью полимеризации: от дисахарида до декасахарида. Эти олигосахариды с одной определенной степенью полимеризации сравнивают по их биологической активности *in vitro* и *in vivo*. Было обнаружено, что гексасахарид имеет самую высокую активность из 9 олигосахаридов, что аналогично результатам, описанным в более ранних патентах, например результатам исследования активности олигосахаридов, описанным в более ранней заявке на патент – документе 1.

Авторы настоящей заявки на патент обнаружили, что когда указанные выше 9 олигосахаридов, имеющие новые структуры, смешаны в определенном соотношении, получается высокоактивная композиция олигосахаридов, имеющая более высокую активность, чем самый активный гексасахарид. Соотношения различных олигосахаридов в высокоактивной композиции олигосахаридов необходимо подбирать согласно следующей пропорции:

Общая масса олигосахаридных маннуриновых дикислот, где  $n=1-5$ , в композиции составляет 80-95% от общей массы композиции, и общая масса олигосахаридных маннуриновых дикислот, где  $n=1-3$ , составляет 20-70% от общей массы композиции. Соотношение общей массы олигосахаридных маннуриновых дикислот, где  $n = 1-3$ , к общей массе олигосахаридных маннуриновых дикислот, где  $n = 4-7$ , составляет от 1,0 до 3,5, предпочтительно от 1,0 до 3,0.

В настоящем изобретении описана формула для приготовления высокоактивной композиции олигосахаридных маннуриновых дикислот.

Композиция олигосахаридных маннуриновых дикислот по настоящему

изобретению может ингибировать повреждение клеток и защищать нервные клетки. В животной модели композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот, описанная в настоящем изобретении, может значительно улучшать обучаемость и когнитивные функции у животных с моделью слабоумия. Поэтому композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот, описанная в настоящем изобретении, имеет потенциальную эффективность в профилактике и лечении болезни Альцгеймера.

В иллюстративном варианте осуществления способ по настоящему изобретению включает следующие стадии:

(1) Получение продукта, представляющего собой маннуроновую дикислоту:

Получение М-сегментного интермедиата. Как описано выше, исходное вещество, используемое в настоящем изобретении (М-сегментный интермедиат), можно получать способом, известным в уровне техники, например способом, описанным в заявке на патент Китая № 98806637.8 и CN02823707.2. Общий способ можно описать следующим образом: альгиновую кислоту предварительно расщепляют, получая полисахаридную смесь полиманнуроновой кислоты и полигулуруновой кислоты; эту полисахаридную смесь подвергают кислотному осаждению для удаления полигулуруновой кислоты; и проводят дальнейшую очистку с получением гомополиманнуроновой кислоты, имеющей чистоту 90% или больше, т.е. М-сегментный интермедиат.

Окислительное расщепление озоном. М-сегментный интермедиат растворяют в подходящем количестве воды и перемешивают при комнатной температуре или при нагревании. Непрерывно пропускают озон для инициирования реакции. Значение рН реакционной смеси доводят до 3-13, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 6-8, посредством добавления по каплям разбавленной соляной кислоты или разбавленного раствора NaOH. Температура предпочтительно составляет 0-70°C, более предпочтительно 10-45°C. После окончания реакции останавливают пропускание озона и доводят значение рН до нейтрального.

Мембранное разделение и очистка. Продукт реакции, полученный, как описано выше, вводят в раствор в концентрации около 10% и разделяют на мембране с отсечением по молекулярной массе, удаляя продукты расщепления размером меньше моносахарида и собирают уловленное мембраной. Используемая мембрана с отсечением по молекулярной массе имеет значение MWCO (номинальное отсечение по молекулярной массе) 1000-3000 Дальтон, предпочтительно 2000 Дальтон. Собранную жидкость упаривают на роторном испарителе и сушат в вакууме, получая смесь олигоманнуроновых дикислот. Было обнаружено, что эти продукты представляют собой композиции, содержащие олигосахариды, т.е. соединения от дисахарида до декасахарида, содержание которых

находится в определенных диапазонах. Эти композиции, А, В и С, были получены согласно описанным далее способам. Соотношения и структуры олигосахаридов в этих композициях были подтверждены в Примерах 1-3.

(2) Получение олигосахаридов с единственной степенью полимеризации.

Смесь олигосахаридов, полученную на стадии (1), растворяют в концентрации около 10%, разделяют на гель-проникающей хроматографической колонке Р6 и применяют ультрафиолетовый детектор для сбора каждого элюируемого компонента. Компоненты, имеющие одинаковую степень полимеризации, объединяют. Собирали девять компонентов от дисахарида до декасахарида, обессоливали их на гель-проникающей хроматографической колонке G10, упаривали на роторном испарителе и сушили в вакууме. Конкретные методики очистки и получения описаны в Примере 4. Указанные операции колоночной хроматографии, обессоливания и сушки хорошо известны специалистам в данной области.

Полученные 9 олигосахаридов с единственной степенью полимеризации оценивали на предмет фармакологической активности в животной модели старческого слабоумия. Было обнаружено, что гексасахарид имеет самую высокую активность. Подробнее описано в Примере 4.

(3) Сравнение активностей олигосахаридных композиций

Олигосахариды с единственной степенью полимеризации, полученные в описанной выше стадии (2), смешивают в массовых соотношениях, указанных в приведенной ниже таблице, получая четвертую композицию, т.е. композицию D. Пропорции олигосахаридов в трех олигосахаридных композициях А, В и С, описанных на стадии (1), и в композиции D приведены ниже в таблице:

	дисаха рид	трисаха рид	тетрасаха рид	пентасаха рид	гексасаха рид	гептасаха рид	октасаха рид	нонасаха рид	декасаха рид
А	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
В	24%	25%	19%	12%	9%	5%	3%	2%	1%
С	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
Д	5%	30%	20%	20%	5%	5%	5%	5%	5%

Описанные выше четыре композиции и гексасахарид, выделенный в чистом виде на стадии (2), сравнивали по фармакологической активности. Результаты показывают, что четыре олигосахаридные композиции А, В, С и D значительно более активны, чем гексасахарид, который имеет самую высокую активность среди олигосахаридов с единственной степенью полимеризации. Видно, что индивидуальный олигосахарид может оказывать синергетическое действие после смешивания. После такого смешивания олигосахариды, которые являются менее активными, чем дисахарид и трисахарид,

становятся более активными, чем гексасахарид.

Резюмируя вышесказанное, в настоящем изобретении описан способ получения высокоактивной композиции олигосахаридных маннурановых дикислот, включающий реакцию окислительного расщепления с применением М-сегментного интермедиата в качестве исходного материала, в присутствии озона, и разделение и очистку продукта реакции на ультрафильтрующей мембране. Данный способ получения прост и обеспечивает высокий выход, а продукт реакции можно легко очистить, получая продукт, имеющий высокую активность. Авторы настоящего изобретения также обнаружили диапазоны массовых процентов и соотношений различных олигосахаридов в высокоактивных композициях. Важность способа получения, описанного в настоящем изобретении, заключается в том, что этим способом получают маннурановые дикислоты, имеющие новую структуру, а именно дикислотный остаток, имеющий 6 возможных структур по восстанавливающему концу сахарной цепочки, и что полученная олигосахаридная композиция содержит умеренные соотношения различных олигосахаридов и имеет высокую биологическую активность.

В настоящем изобретении описано также лекарственное средство или продукт для ухода за здоровьем, содержащий описанную выше композицию олигосахаридных маннурановых дикислот и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Способы получения лекарственных средств, представляющих собой комбинацию олигосахаридов и содержащих действующие вещества в различных соотношениях, известны или будут очевидны специалистам в данной области из описания настоящего изобретения, например, они описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995). Способы приготовления фармацевтической композиции включают введение подходящих фармацевтических вспомогательных веществ, носителей, разбавителей и т.п.

Фармацевтический препарат по настоящему изобретению готовят известным способом, включающим обычное смешивание, растворение или лиофилизацию.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить пациенту различными способами, подходящими для выбранного пути введения, например перорально или парентерально (внутривенно, внутримышечно, местно или подкожно).

Соответственно, комбинированное лекарственное средство по настоящему изобретению можно вводить системно, например перорально, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как инертный разбавитель или съедобный носитель. Его можно заключать в твердые или мягкие желатиновые капсулы,

или его можно прессовать в таблетки. Для перорального терапевтического введения, действующее вещество по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или более вспомогательными веществами и применять в форме таблеток для проглатывания, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, рифленых пластинок и т.п. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 0,1% действующего вещества. Содержание в композициях и препаратах может, разумеется, варьироваться и может находиться в диапазоне от около 1% до около 99% от веса единичной дозированной формы. Количество действующего вещества в таких терапевтически применимых композициях должно быть таким, чтобы обеспечить эффективный уровень дозировки.

Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и т.п. могут также содержать: связующее вещество, такое как трагакантовая камедь, смола акации, кукурузный крахмал или желатин; вспомогательное вещество, такое как дикальция фосфат; разрыхлитель, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и т.п.; лубрикант, такой как стеарат магния; и подсластитель, такой как сахароза, фруктоза, лактоза или аспартам; или ароматизатор, такой как перечная мята, винтергринное масло или вишневый ароматизатор. Когда единичная дозированная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо веществ перечисленных выше типов, жидкий носитель, такой как растительное масло или полиэтиленгликоль. Различные другие вещества могут присутствовать в качестве покрытия или каким-либо иным образом модифицировать физическую форму твердой единичной дозированной формы. Например, на таблетки, пилюли или капсулы может быть нанесено покрытие из желатина, воска, шеллака или сахара. Сиропы или эликсиры могут содержать действующее вещество, сахарозу или фруктозу в качестве подсластителя, метилапарабен или пропилпарабен в качестве консерванта, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Разумеется, любое вещество, используемое для приготовления любой дозированной формы, должно быть фармацевтически приемлемым и нетоксичным в применяемых количествах. Кроме того, действующее вещество может быть включено в состав препарата с замедленным высвобождением или в состав устройства с замедленным высвобождением.

Действующее вещество можно также вводить внутривенно или интраперитонеально посредством инфузии или инъекции. Растворы действующего вещества или его соли можно готовить в воде, при необходимости смешанной с нетоксичным поверхностно-активным веществом. Дисперсии можно также готовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, триацетине и их смесях, и в маслах. В обычных

условиях хранения и применения, эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические дозированные формы, подходящие для инъекций или инфузий, могут включать стерильные водные растворы или дисперсии, или стерильные порошки действующего вещества (необязательно инкапсулированные в липосомах), включенные в препараты для приготовления непосредственно перед применением стерильного раствора или дисперсии, подходящей для инъекций или инфузий. Во всех случаях финальная дозированная форма должна быть стерильной, жидкой и устойчивой в условиях производства и хранения. Жидкий носитель может представлять собой растворитель или жидкую дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), растительные масла, нетоксичные глицериды и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем формирования липосом, поддерживая необходимый размер частиц в случае дисперсии, или путем применения поверхностно-активных веществ. Противомикробное действие можно обеспечить за счет различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать в состав изотонические агенты, например сахара, буферные добавки или хлорид натрия. Замедленное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить применением агентов, замедляющих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы готовят путем введения действующего вещества в необходимое количество подходящего растворителя, при необходимости с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизацией. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые дают порошок действующего вещества плюс любой желаемый дополнительный ингредиент из их предварительно стерильно профильтрованного раствора.

Подходящие твердые носители включают измельченные твердые вещества (например, тальк, глину, микрокристаллическую целлюлозу, силикагель, оксид алюминия и т.п.). Подходящие жидкие носители включают воду, этанол, этиленгликоль или смесь вода-этанол/этиленгликоль. Комбинированное лекарственное средство по настоящему изобретению можно растворять или диспергировать в носителе в эффективном количестве, при необходимости с помощью нетоксичного поверхностно-активного

вещества. Адьюванты (такие как отдушки) и дополнительные противомикробные средства можно добавлять для оптимизирования свойств для конкретной области применения.

Загустители (такие как синтетические полимеры, жирные кислоты, соли и эфиры жирных кислот, жирные спирты, модифицированные целлюлозы или модифицированные неорганические вещества) также можно применять с жидкими носителями для формирования паст, гелей, мазей, мыла и т.д., которые можно наносить непосредственно на кожу потребителя.

Терапевтически необходимое количество соединения или их смеси зависит не только от соединения самого по себе, но также от способа введения, природы заболевания, которое подвергается лечению, и возраста и состояния пациента, и в конечном итоге оно зависит от решения лечащего врача или клинициста.

Описанные выше препараты можно выпускать в однократных дозированных формах, которые представляют собой физически отдельный блок, содержащий единичную дозу и подходящий для введения человеку и другим млекопитающим. Единичная дозированная форма может представлять собой капсулу или таблетку или множество капсул или таблеток. Количество действующего вещества в единичной дозированной форме может варьироваться или составляет от около 0.1 до около 1000 мг или больше, в зависимости от конкретного вида лечения.

#### Животная модель и стадии оценки эффективности и активности

1. Животная модель для оценки эффективности против болезни Альцгеймера (AD): AD модель индуцируется односторонней внутрижелудочковой инъекцией A $\beta$ ; обучаемость и память у крыс с моделью AD оценивают по тесту водного лабиринта Морриса.

Используют самцов крыс линии Wistar, вес которых составляет от 180 до 220 г. Рандомизация: контрольная группа с имитацией операции, модельная группа и группы на разной дозировке, по 14 животных в группе. Крысам дают анестезию в виде интраперитонеальной инъекции пентобарбитала натрия (40 мг/кг) и фиксируют на стереотаксическом аппарате. Рутинным образом подготавливают кожу, стерилизуют, разрезают и открывают лобный родничок. Гиппокампальный участок CA1 расположен в положении “3,0 мм за передним родничком, в 2,2 мм от линии соединения, и в 2,8 мм под твердой мозговой оболочкой” как описано в работе Stereotaxic Map of Rat Brain, Xinming Bao and Siyun Shu, Beijing, People's Medical Publishing House, 1991, 28. Для модельной группы и групп на разных дозировках, 5 мкл агрегированного A $\beta$  (A $\beta$ 1-40 в фосфатно-солевом буфере (PBS) в количестве 1,4 мг/мл, инкубируют при 37°C в течение 5 дней с

образованием агрегированного состояния) медленно инъецируют в правый гиппокампальный участок CA1 с помощью микроиглы вертикально к черепу, со скоростью введения 1 мкл/мин. После окончания инъецирования оставляют иглу на 5 минут, чтобы Аβ мог распределиться в достаточной степени. Затем иглу медленно извлекают. Хирургический разрез зашивают и держат в тепле для восстановления. Контрольной группе проводят такую же процедуру, за исключением того, что инъецируют такое же количество стерильного PBS. Соответствующее лекарственное средство вводят за 7 дней до операции, и введение продолжают до конца эксперимента.

Тест водного лабиринта Морриса проводят на 11-й день после операции.

Тест ориентации на местности: Каждую группу крыс тренируют один раз в день в течение 5 последовательных дней, посредством теста ориентации на местности. Регистрируют время, затраченное животными на поиск платформы (латентность спасения). Крыс, которые не смогли найти платформу примерно за 90 секунд, заставляют плыть к платформе по прямой линии и оставаться на платформе в течение 30 секунд, чтобы стимулировать обучение и память.

Пространственный тест: На второй день после окончания теста ориентации на местности, платформу убирают, и крыс помещают в воду начиная с точки входа. Регистрируют количество раз, когда животное проходило через платформу, и процент дистанции, проплытой в квадранте бывшего расположения платформы, относительно общей дистанции. Оценивали функции обучаемости и памяти у животных.

2. Модель для оценки жизнеспособности клеток: клетки SH-SY5Y (клетки нейробластомы) высевали в 96-луночный планшет (3000 клеток на лунку). Через 24 часа среду убирали и добавляли лекарственное средство для предварительной обработки в течение 0,5 часа (раствор в культуральной среде, не содержащей сыворотки; 3 повторности на дозировку). Затем добавляли агрегированный Аβ1-42 (Аβ1-42 растворяли в растворе PBS в концентрации 1 мг/мл и инкубировали при 4°C в течение 24 часов для формирования агрегированного состояния, финальная концентрация 2 мкМ) и инкубировали в течение 48 часов. Жизнеспособность клеток детектировали с помощью ССК8.

Преимущества настоящего изобретения дополнительно проиллюстрированы в приведенных ниже неограничивающих примерах. Однако, конкретные вещества и их количества, а также другие условия экспериментов, применявшиеся в описанных примерах, не должны пониматься как ограничивающие настоящее изобретение. Все части, соотношения, процентные содержания и т.п. в настоящем изобретении приведены по массе, если иное не указано особо.



## Примеры

### Пример 1

Стадия 1): Получение смеси олигосахаридных маннуроновых дикислот

М-сегментный интермедиат получали способом, описанным в более ранних патентах. Конкретные операции вкратце описаны ниже: из 5 кг альгината натрия делали 10%-ный раствор и доводили значение рН примерно до 3,0 добавлением разбавленной соляной кислоты. Раствор нагревали до 80°C и перемешивали. Оставляли для протекания реакции на 10 часов, после чего нагрев прекращали. После охлаждения до комнатной температуры доводили значение рН до 9,0 добавлением NaOH и затем до 2,85 добавлением разбавленной соляной кислоты. Раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Собирали надосадочный раствор и доводили значение рН до 1,0 добавлением HCl. После центрифугирования собирали осадок, упаривали на роторном испарителе и сушили в вакууме, получая 1500 г М-сегментный интермедиат. Отвешивали 500 грамм М-сегментного интермедиата и растворяли в дистиллированной воде, получая раствор объемом 5 литров. Значение рН раствора доводили до 6,5 добавлением NaOH и нагревали на водяной бане, поддерживая температуру прохождения реакции равной 75°C. Скорость потока газа на выходе из кислородного баллона и мощность генератора озона регулировали таким образом, чтобы озон подавался в реакционный раствор в массовой концентрации 8 грамм в час. После 4 часов протекания реакции останавливали подачу озона и добавляли необходимое количество воды, чтобы довести концентрацию раствора примерно до 10%. Раствор фильтровали через ультрафильтрующую мембрану с отсечением по молекулярному весу 2000 Дальтон, получая ретентат. Собранный жидкость упаривали на роторном испарителе и сушили в вакууме, получая 350 г маннуроновой дикислоты продукта А.

Стадия 2): Анализ соотношений и структур олигосахаридов с разной степенью полимеризации в маннуроновой дикислоте продукте А.

100 мг описанного выше маннуроновой дикислоты продукта А аккуратно взвешивали, растворяли в воде до концентрации 10 мг/мл и пропускали через фильтровальную мембрану 0,22 мкм, получая раствор для проведения теста. Соотношение олигосахаридов с разной степенью полимеризации в композиции определяли геле-эксклюзионной хроматографией на колонке Superdex peptide (GE Co.) в комбинации с многоугловым лазерным рассеянием (MALS, Wyatt Co.). Использовались следующие условия эксперимента:

Хроматографическая колонка: Superdex peptide 10/300G1

Подвижная фаза: 0,1 моль/л NaCl

Объем ввода: 10 мкл

Скорость потока: 0,3 мл/мин

Результаты теста: олигосахариды от дисахарида до декасахарида dp2 - dp10 присутствовали в количестве, соответственно. dp2 = 19%, dp3 = 25%, dp4 = 22%, dp5 = 13%, dp6 = 9%, dp7 = 6%, dp8 = 3%, dp9 = 2%, и dp10 = 1%.

Стадия 3): LC-MS анализ структуры олигосахаридов с разными степенями полимеризации в маннуроновой дикислоте продукте А

Условия эксперимента:

Хроматографическая колонка: Superdex peptide 10/300Gl

Подвижная фаза: 20% метанол + 80% 80 ммоль/л NH<sub>4</sub>Ac

Скорость потока: 0,1 мл/мин

Температура колонки: 25±0,8°C.

Условия проведения масс-спектрометрии: Agilent 6540 QTOF; источник ионов: ESI (ионизация электроспреем), напряжение столкновения 120 В; режим регистрации отрицательно заряженных ионов. Регистрировались сигналы ионов (m/z) от 100 до 1000.

Масс-спектры олигосахаридов с разными степенями полимеризации приведены на фиг. 1-3. Пики в масс-спектрах подтвердили молекулярные структуры всех олигосахаридов в продукте А, т.е. структуры, показанные в Формуле (III). Отнесение сигналов и структур, соответствующих этим сигналам, приведено ниже в таблице 1.

Таблица 1. 6 дикислотных структур олигосахаридов с разными степенями полимеризации в продукте А и их отношения масса/заряд в масс-спектрах

№	Молекулярная структура	Молекулярная формула	Отношение масса/заряд (m/z)								
			n=1 [M-1] <sup>+</sup>	n=2 [M-1] <sup>+</sup>	n=3 [M-1] <sup>+</sup>	n=4 [M-1] <sup>+</sup>	n=5 [M-1] <sup>+</sup>	n=6 [M-1] <sup>+</sup>	n=7 [M-2] <sup>2+</sup>	n=8 [M-2] <sup>2+</sup>	n=9 [M-2] <sup>2+</sup>
1		$(C_6H_8O_6)_n C_6H_{10}O_8$ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		$(C_6H_8O_6)_n C_5H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		$(C_6H_8O_6)_n C_5H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		$(C_6H_8O_6)_n C_3H_4O_5$ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

На основе результатов описанного выше масс-спектрального анализа структуры было обнаружено, что маннуриновая кислота по восстанавливающему концу сахарной цепочки в продукте А была окислена до структуры типа сахарной кислоты (см. Формулу III), которая могла бы представлять собой структуру маннариновой кислоты, содержащую 6 атомов углерода ( $m+m'=3$ ), с содержанием около 10-30%, или продукт декарбоксилирования маннариновой кислоты, т.е. сахарную кислоту, содержащую 5 атомов углерода ( $m+m'=2$ ) (30-50%), и сахарную кислоту, содержащую 4 атома углерода ( $m+m'=1$ ) (30-40%).

#### Стадия 4) Оценка фармакологической активности

1. Защитный эффект продукта А при А $\beta$ -индуцированном повреждении нервных клеток.

Проводили тест согласно “модели оценки жизнеспособности клеток”, по следующей экспериментальной методике: клетки SH-SY5Y (клетки нейробластомы) высевали в 96-луночный планшет (3000 клеток на лунку). Через 24 часа среду убирали и, для групп на разных дозировках, добавляли 10 мкл на лунку лекарственного средства (10 мг/мл) для предварительной обработки в течение 0,5 часа (раствор в культуральной среде, не содержащей сыворотки; 3 повторности на дозировку). Затем добавляли агрегированный А $\beta$ 1-42 (А $\beta$ 1-42 растворяли в растворе PBS в концентрации 1 мг/мл и инкубировали при 4°C в течение 24 часов для формирования агрегированного состояния, финальная концентрация 2 мкМ) и инкубировали в течение 48 часов. Жизнеспособность клеток детектировали с помощью ССК8.

Результаты показали, что обработка SH-SY5Y клеток 2 мкМ А $\beta$ 1-42 могла вызвать значительное повреждение клеток и уменьшить жизнеспособность клеток через 48 часов, в то время как 25, 50 и 100 мкг/мл продукта А могли существенно подавлять А $\beta$ -вызванное снижение жизнеспособности клеток; см. фиг. 4. Представленные выше результаты показывают, что продукт А может защищать нервные клетки от токсических эффектов А $\beta$  в низкой концентрации (25 мкг/мл), средней концентрации (50 мкг/мл) и высокой концентрации (100 мкг/мл).

#### Пример 2

100 граммов М-сегментного интермедиата из Примера 1 взвешивали и растворяли в дистиллированной воде, получая раствор объемом 0,8 л. Значение рН этого раствора довели до 4,0 с помощью NaOH и проводили реакцию при комнатной температуре (25°C). Скорость потока газа на выходе из кислородного баллона и мощность генератора озона регулировали таким образом, чтобы озон подавался в реакционный раствор в массовой концентрации 1 грамм в час. После 10 часов протекания реакции останавливали

подачу озона и добавляли необходимое количество воды, чтобы довести концентрацию раствора примерно до 15%. Раствор фильтровали через ультрафильтрующую мембрану с отсечением по молекулярному весу 1000 Дальтон, получая ретентат. Собранную жидкость упаривали на роторном испарителе и сушили в вакууме, получая 80 г маннуронової дикислоты продукта В.

Соотношение олигосахаридов с разной степенью полимеризации в продукте В определяли гель-эксклюзионной хроматографией на колонке Superdex peptide (GE Co.) в комбинации с многоугловым лазерным рассеянием (MALS, Wyatt Co.). Метод измерения был таким же, как в Примере 1. Результаты теста: олигосахариды от дисахарида до декасахарида, обозначенные dp2 - dp10, соответственно, присутствовали в следующих количествах. dp2 = 24%, dp3 = 25%, dp4 = 19%, dp5 = 12%, dp6 = 9%, dp7 = 5%, dp8 = 3%, dp9 = 2%, и dp10 = 1%.

#### Пример 3

100 граммов М-сегментного интермедиата из Примера 1 взвешивали и растворяли в дистиллированной воде, получая раствор объемом 1,5 л. Значение pH этого раствора доводили до 9,0 с помощью NaOH и проводили реакцию на водяной бане при 45°C. Скорость потока газа на выходе из кислородного баллона и мощность генератора озона регулировали таким образом, чтобы озон подавался в реакционный раствор в массовой концентрации 3 грамма в час. После 2 часов протекания реакции останавливали подачу озона и добавляли необходимое количество воды, чтобы довести концентрацию раствора примерно до 5%. Раствор фильтровали через ультрафильтрующую мембрану с отсечением по молекулярной массе 3000 Дальтон, получая ретентат. Собранную жидкость упаривали на роторном испарителе и сушили в вакууме, получая 60 г маннуронової дикислоты продукта С.

Соотношение олигосахаридов с разной степенью полимеризации в продукте С определяли гель-эксклюзионной хроматографией на колонке Superdex peptide (GE Co.) в комбинации с многоугловым лазерным рассеянием (MALS, Wyatt Co.). Метод измерения был таким же, как в Примере 1. Результаты теста: олигосахариды от дисахарида до декасахарида, обозначенные dp2 - dp10, соответственно, присутствовали в следующих количествах. dp2 = 8%, dp3 = 20%, dp4 = 28%, dp5 = 19%, dp6 = 13%, dp7 = 6%, dp8 = 3%, dp9 = 2%, и dp10 = 1%.

#### Пример 4

Стадия 1) Получение олигосахаридных маннуроновоїх дикислот с единственной степенью полимеризации, которое проводили по следующей методике:

1. Приготовление образца: 300 г маннуронової дикислоты продукта А,

полученного в Примере 1, растворяли в воде с получением 1000 мл концентрированного раствора, который для использования помещали в холодильник с температурой 4°C. При каждом использовании 50 мл раствора разбавляли водой в пропорции 1:2, и затем фильтровали при отсасывании через 0,22 мкм ультрафильтрующую мембрану.

2. Условия хроматографического разделения: Использовали хроматограф АКТА pure 150 (от GE Co.), оснащенный УФ-детектором и автоматическим коллектором фракций. Хроматографическая колонка, использовавшаяся для разделения: 1,2 кг BioGel P6 (от Bio-Rad Co.) смешивали с деионизованной водой, дегазировали в вакууме, вручную фильтровали в стеклянную колонку (внутренний диаметр: 10 см), промывали чистой водой в количестве 10 объемов колонки. Слой в хроматографической колонке был стабилен, и его высота составляла 1,0 м. Затем подвижную фазу заменяли на 0,02 М раствор NaCl и, после уравнивания с 10 объемами колонки, начинали загрузку образца.

3. Загрузка и разделение: Скорость потока на насосе устанавливали равной 1 мл/мин. После того, как 100 мл раствора образца закачали на верх колонки через собственный насос хроматографа, переключались на подвижную фазу и элюировали со скоростью 5 мл/мин. После вымывания мертвого объема колонки, включали автоматический коллектор фракций и собирали в пробирки фракции по 50 мл.

4. Повторяли загрузку образца, и после 20 повторов разделения объединяли одинаковые фракции, упаривали их на роторном испарителе и лиофилизовывали, получая всего 9 олигосахаридов с единственной степенью полимеризации – от дисахарида до декасахарида.

#### Стадия 2) Оценка фармакологической активности

Фармакологическую активность олигосахаридных олигоманнуровых кислот с единственной степенью полимеризации оценивали следующим образом:

1. Защитный эффект олигосахаридов при Аβ-индуцированном повреждении нервных клеток

Эксперимент проводили таким же образом, как описано в Примере 1, и растворы олигосахаридов готовили в концентрации 10 мг/мл.

Результаты показали, что обработка клеток SH-SY5Y 2 мкМ Аβ1-42 может вызвать значительное повреждение клеток и пониженную жизнеспособность клеток после 48 часов, а все олигосахаридные маннуроновые дикислоты с единственной степенью полимеризации проявляли тенденцию к ингибированию Аβ-индуцированного повреждения клеток. Олигосахаридные маннуроновые дикислоты со степенью полимеризации 4-10 (финальная концентрация лекарственных соединений составляла 25

мкг/мл) могли в значительной степени защитить нервные клетки от токсического действия Аβ, и среди них олигосахариды со степенями полимеризации от 5 до 8 проявляли лучшее действие, а гексасахарид имел наивысшую активность, см. фиг. 5.

2. Влияние олигосахаридов на модель с нарушением обучаемости и памяти, вызванным правосторонней интравентрикулярной инъекцией Аβ1-40 у крыс

Повторяли экспериментальную методику на 10 г каждого олигосахаридов от дисахаридов до декасахаридов согласно методике, описанной для “животной модели для оценки эффективности против AD”.

Из-за большого числа олигосахаридных кислот с единственной степенью полимеризации эксперимент проводили в нескольких партиях. Сравнение и оценку эффективностей разных олигосахаридов проводили, вычисляя процент числа раз, когда животные в каждой группе пересекали платформу, относительно числа раз, когда контрольная группа животных с имитацией операции пересекала платформу. Результаты показали, что число пересечений платформы значительно уменьшалось в модельной группе по сравнению с контрольной группой с имитацией операции. Каждый олигосахарид с единственной степенью полимеризации увеличивал число пересечений платформы. Олигосахаридные маннуроновые дикислоты с единственной степенью полимеризации 4-10 могли значительно увеличивать число пересечений платформы, и среди них олигосахариды со степенями полимеризации от 5 до 8 проявляли лучшее действие, а гексасахарид имел наивысшую активность, см. фиг. 6.

#### Пример 5

Определяли фармакологическую активность композиций и гексасахаридов для оценки синергетического эффекта в композициях олигосахаридов с разными степенями полимеризации и соотношениями олигосахаридов.

Приготовление образцов: аккуратно отвешивали олигосахаридные маннуроновые дикислоты с единственной степенью полимеризации, полученные в Примере 4, от дисахаридов до декасахаридов. Применяли следующие веса каждого сахара: 0,5 г дисахаридов, 3,0 г трисахаридов, 2,0 г тетрасахаридов, 2,0 г пентасахаридов, 0,5 г гексасахаридов, 0,5 г гептасахаридов, 0,5 г октасахаридов, 0,5 г нонасахаридов и 0,5 г декасахаридов. Их смешивали, получая 10 г композиции D.

Соотношения олигосахаридов в продуктах А, В и С, полученных в Примерах 1, 2 и 3, соответственно, и в продукте D, полученном в предыдущем Примере, приведены ниже в таблице 2.

Таблица 2. Процентное содержание олигосахаридов в продуктах, представляющих собой композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот

Ком-позиция	Доля								
	дисахарид	трисахарид	тетрасахарид	пентасахарид	гексахарид	гептасакхарид	октасакхарид	нонасахарид	декасахарид
А	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
В	24%	25%	19%	12%	9%	5%	3%	2%	1%
С	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
Д	5%	30%	20%	20%	5%	5%	5%	5%	5%

Использовали по 10 г каждого из описанных выше образцов А, В, С и D для сравнения фармакологической активности указанных композиций и гексахарида (6Т) согласно методике, описанной в "животной модели для оценки эффективности против AD".

В этом эксперименте в сравнении с контрольной группой с имитацией операции животные в модельной группе имели значительно более длительную задержку поиска платформы, и это указывает на то, что модель для оценки была успешной. В сравнении с модельной группой каждая из групп на разных дозировках имела значительно более короткую задержку поиска платформы.

Был один день отдыха по окончании обучения ориентации на местности. Затем платформу убрали и проводили пространственный тест для подсчета числа раз, когда животные пересекали платформу, и процента дистанции, проплытой в квадранте бывшего расположения платформы относительно общей дистанции, оценивая функцию памяти у животных. Результаты показали, что число пересечений платформы было значительно снижено в модельной группе и значительно увеличено в группах на разных дозировках по сравнению с контрольной группой с имитацией операции, как показано на фиг. 7. Процент дистанции, проплытой в квадранте бывшего расположения платформы, относительно общей дистанции показал такую же тенденцию, как и число пересечений платформы. По сравнению с контрольной группой с имитацией операции процент дистанции, проплытой в квадранте бывшего расположения платформы, относительно общей дистанции был значительно снижен в модельной группе и значительно увеличен в группах на разных дозировках, как показано на фиг. 8.

Результаты экспериментов показали, что соответствующая фармакологическая активность композиций олигосахаридов А, В, С и D была все еще очень высокой в день 4, и выше, чем активность гексахарида с единственной степенью полимеризации, что говорит о синергии между олигосахаридами в композициях.



### Пример 6

Применяли технику совместного выращивания клеток для дополнительного определения активности различных олигосахаридов с единственной степенью полимеризации и композиций.

Необходимые количества олигосахаридов с единственной степенью полимеризации, полученных в Примере 4, и полученного в Примере 1 продукта А, представляющего собой композицию олигосахаридов, аккуратно отвешивали и растворяли в PBS, получая растворы лекарственных средств для тестирования с концентрацией 10 мг/мл.

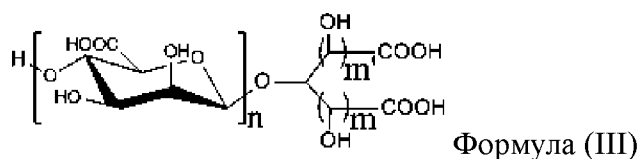
Эксперимент с совместно выращиваемыми клетками был практически таким же, как метод с культурами клеток в предшествующих Примерах 1 и 4. Основное отличие заключается в том, что техника совместного выращивания клеток имитирует взаимодействие разных клеток *in vivo*. Учитывая, что *in vivo* клетки могут взаимодействовать между собой через сигнальные механизмы, для более точного моделирования окружения *in vivo* и стимулирования взаимодействий между разными клетками во время развития AD, в культуру вводили клетки микроглии. Применяли следующую методику эксперимента: клетки SH-SY5Y (клетки нейробластомы) высевали в 24-луночный планшет (12000 клеток на лунку), и клетки BV-2 cells (клетки микроглии) высевали в верхнюю камеру в концентрации 15000 клеток на лунку. Через 24 часа удаляли среду и добавляли растворы испытуемых лекарственных средств в нижнюю камеру, создавая финальную концентрацию лекарственного средства 25 мг/мл. После 0,5 часа обработки (в культуральной среде, не содержащей сыворотки; 3 повторности на каждый раствор лекарственного средства), добавляли агрегированный A $\beta$ 1-42 (A $\beta$ 1-42 растворяли в растворе PBS в концентрации 1 мг/мл и инкубировали при 4°C в течение 24 часов для формирования агрегированного состояния, финальная концентрация 2 мкМ) и инкубировали в течение 48 часов. Выживаемость клеток SH-SY5Y в нижней камере детектировали с помощью ССК8.

Через 48 часов модельную группу сравнивали с нормальной контрольной группой. В первой наблюдались значительные повреждения и пониженная выживаемость клеток. В группах на разной дозировке наблюдался эффект подавления A $\beta$ -индуцированного повреждения клеток. В частности, активность продукта А была значительно выше, чем активность других девяти олигосахаридов с единственной степенью полимеризации, как показано на фиг. 9. Модель с совместным выращиванием клеток может выявить различие в активности между композицией и олигосахаридами с единственной степенью полимеризации, возможно потому что может наблюдаться синергетический эффект между

цитокинами, высвобождаемыми клетками микроглии, и олигосахаридами с разной степенью полимеризации в композиции, который повышает активность композиции олигосахаридов.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот, содержащая маннуроновую дикислоту, имеющую Формулу (III), или ее фармацевтически приемлемую соль:



где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 9,  $m$  равно 0, 1 или 2, и  $m'$  равно 0 или 1,

и где

общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-5$ , составляет 80-95% от общей массы композиции; и

отношение общей массы маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , к общей массе маннуроновых дикислот, у которых  $n = 4-7$ , лежит в диапазоне от 1,0 до 3,5.

2. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 1, в которой общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $m + m' = 1$  или 2, составляет не меньше 50%, предпочтительно 60-90%, более предпочтительно 70-90% от общей массы композиции.

3. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 2, в которой общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $m + m' = 1$ , составляет не меньше 10%, предпочтительно 30-40% от общей массы композиции.

4. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 1, в которой общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $m + m' = 2$ , составляет не меньше 10%, предпочтительно 30-50% от общей массы композиции.

5. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 1, в которой общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-5$ , составляет 80-95% от общей массы композиции.

6. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 1, в которой общая масса маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , составляет 20-70% от общей массы композиции.

7. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 1, в которой соотношение общей массы маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , к общей массе маннуроновых дикислот, у которых  $n = 4-7$ , составляет от 1,0 до 3,5.

8. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 7, в которой соотношение общей массы маннуроновых дикислот, у которых  $n = 1-3$ , к общей массе маннуроновых дикислот, у которых  $n = 4-7$ , составляет от 1,0 до 3,0.

9. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по любому из пп. 1-8, в которой массовые проценты маннуроновых дикислот с разной степенью полимеризации в композиции составляют: 5-25% дисахарида, 15-30% трисахарида, 15-25% тетрасахарида, 10-25% пентасахарида, 5-15% гексасахарида, 3-10% гептасахарида, 2-5% октасахарида, 1-5% нонасахарида и 1-5% декасахарида.

10. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по п. 9, в которой массовые проценты маннуроновых дикислот с разной степенью полимеризации в композиции составляют: 10-20% дисахарида, 18-30% трисахарида, 15-25% тетрасахарида, 15-20% пентасахарида, 5-10% гексасахарида, 3-5% гептасахарида, 2-3% октасахарида, 1-3% нонасахарида и 1-3% декасахарида.

11. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по любому из пп. 1-10, в которой фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль или калиевую соль.

12. Фармацевтическая композиция или продукт для ухода за здоровьем, содержащая(ий) эффективное количество композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по любому из пп. 1-11 и, при необходимости, подходящий носитель.

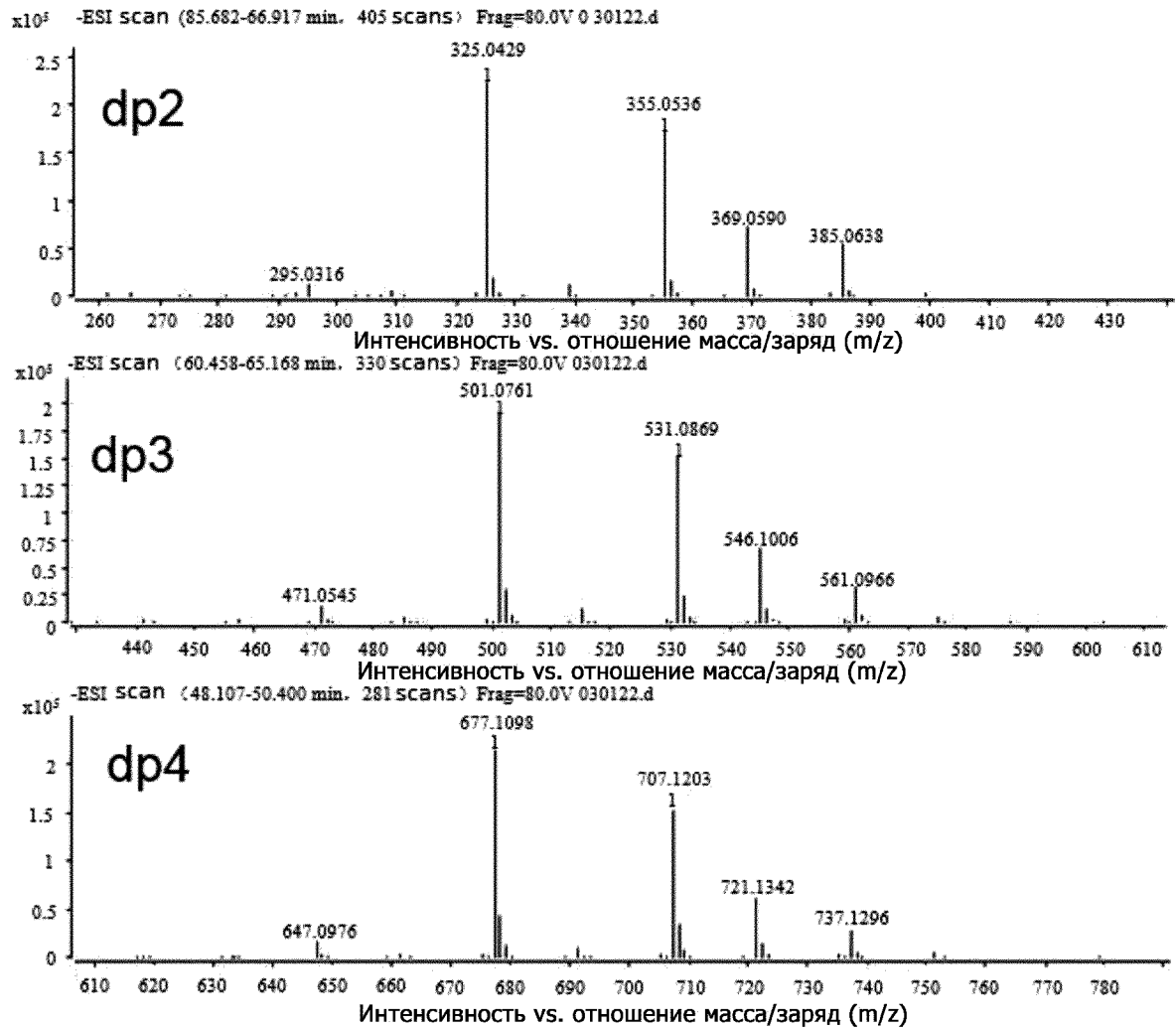
13. Применение композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по любому из пп. 1-11 в производстве лекарственного средства или продукта для ухода за здоровьем против старческого слабоумия.

14. Композиция олигосахаридных маннуроновых дикислот по любому из пп. 1-11 для применения в качестве лекарственного средства или продукта для ухода за здоровьем против старческого слабоумия.

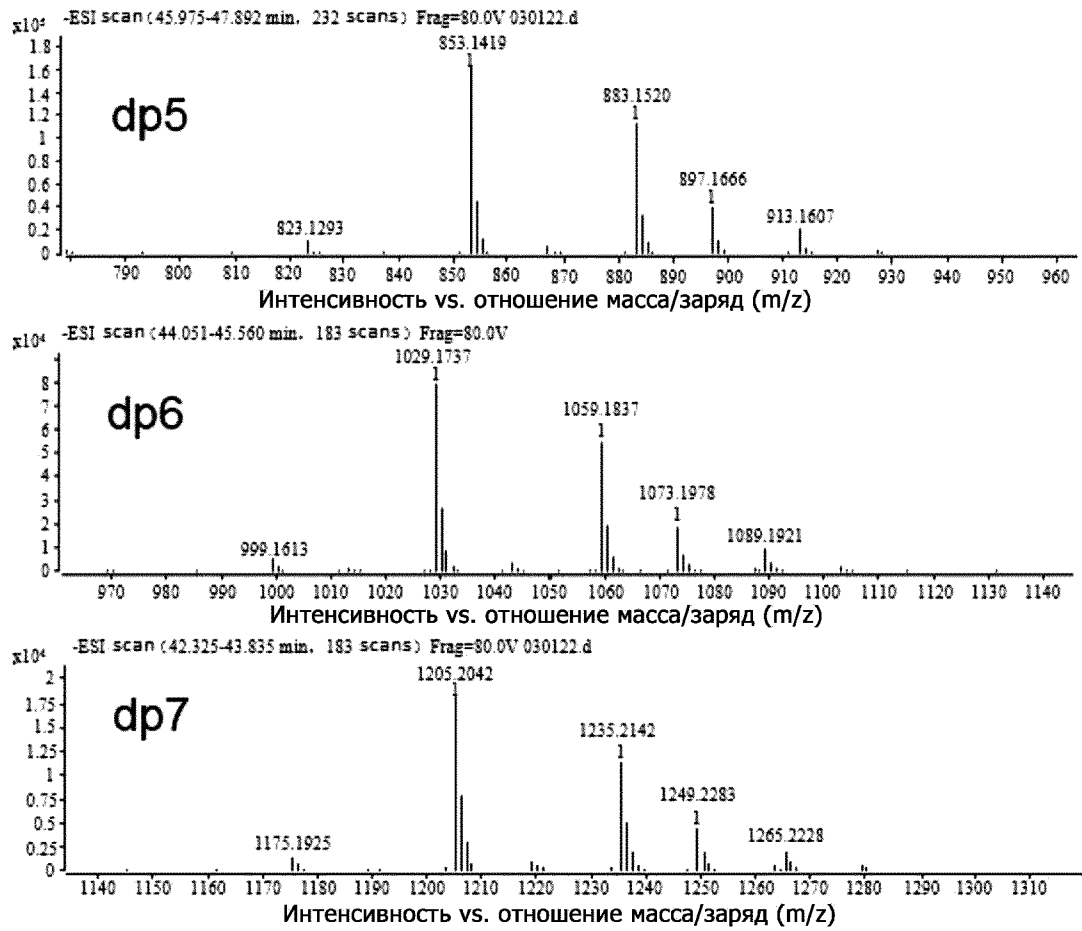
15. Способ лечения пациента, страдающего старческим слабоумием, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции олигосахаридных маннуроновых дикислот по любому из пп. 1-11.

16. Способ получения олигосахаридных маннуроновых дикислот и их композиции путем окислительного расщепления озоном, посредством которого получают компоненты или композицию по любому из пп. 1-11.

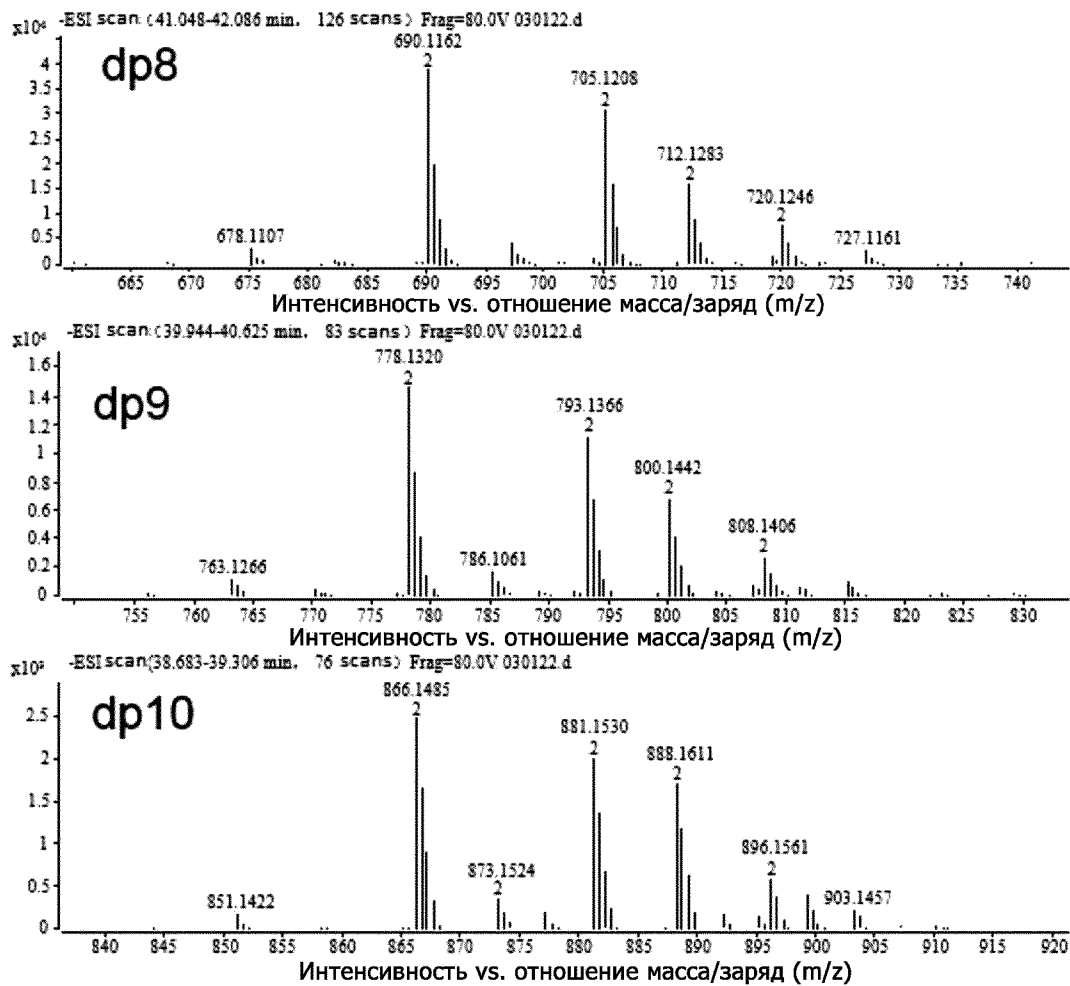
17. Способ получения олигосахаридов и их композиции посредством окислительного расщепления озоном по п. 16, в котором: реакцию окисления предпочтительно проводят при температуре 0-70°C, более предпочтительно 10-45°C; стадию окислительного расщепления проводят при pH от 3 до 13, предпочтительно от 4 до 10, более предпочтительно от 6 до 8.



Фиг. 1

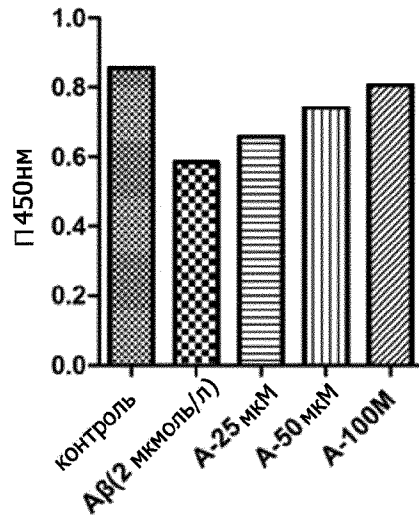


Фиг. 2

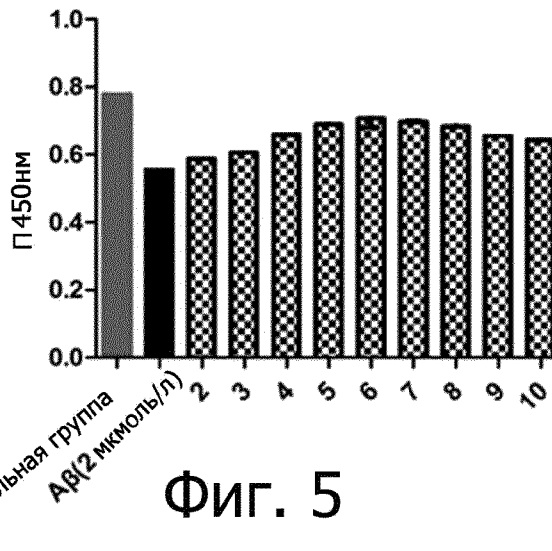


Фиг. 3

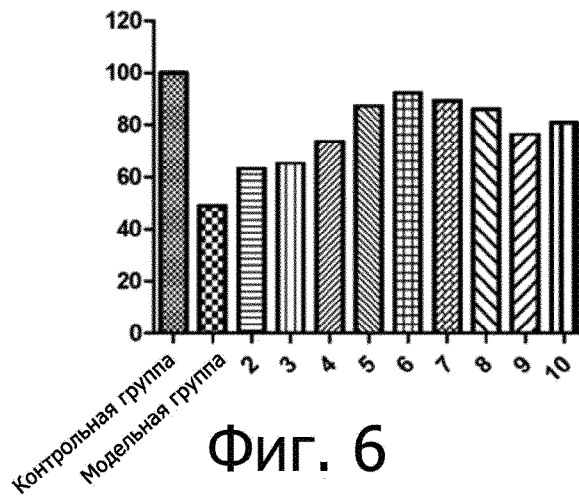
4/5



ФИГ. 4

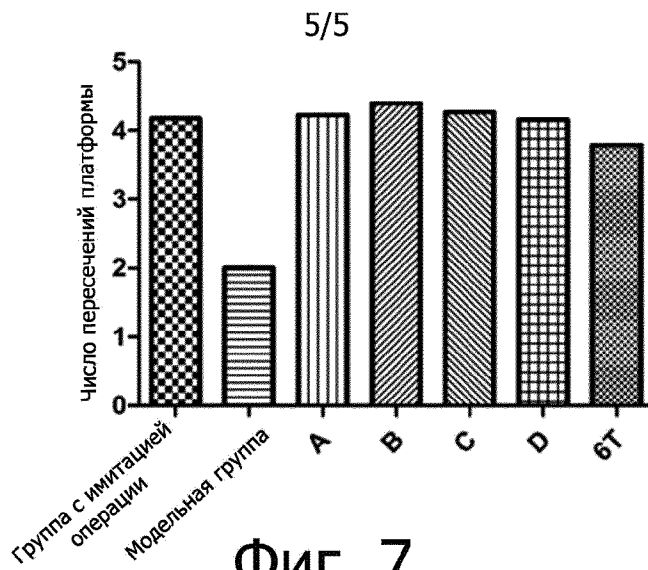


ФИГ. 5

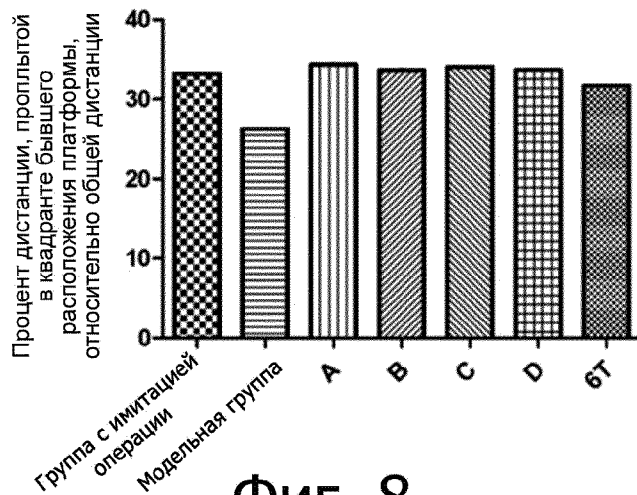


ФИГ. 6

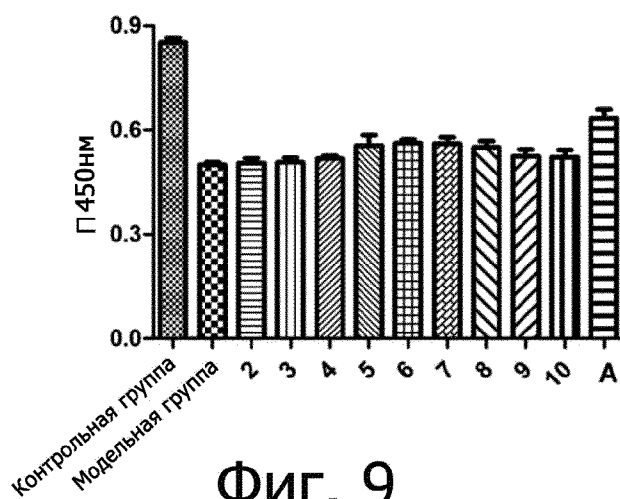




ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9