

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039078**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.11.30**

(51) Int. Cl. **C07H 1/00 (2006.01)**  
**C07H 7/033 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201990502**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.08.15**

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЛИГОМАННУРОНОВЫХ ДИКИСЛОТ**

---

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/CN2016/095368**

(87) **WO 2018/032272 2018.02.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ГРИН ВЭЛИ (ШАНХАЙ)  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО., ЛТД. (CN)**

(56) **CN-C-100508985  
GB-A-289280  
WO-A1-0232913**

THABURET, J.-F. et al. TEMPO-mediated Oxidation of Maltodextrins and D-glucose: Effect of pH on the Selectivity and Sequestering Ability of the Resulting Polycarboxylates Carbohydrate Research. 31 December 2001 (31 12 2001), vol 330 , pp 21-29, see page 27, and figure 3

(72) Изобретатель:  
**Сяо Чжунпин, Чжан Чжэньцин, Гэнг  
Мэйю, Дин Цзянь (CN)**

(74) Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к новому способу получения олигоманнуроновых кислот, важных биологически активных веществ. В способе используются олигоманнуроновые кислоты в качестве исходных материалов, а целевые вещества получают путем кислотной деградации и активного окисления бромноватистой кислотой. Способ получения олигоманнуроновых дикислот согласно изобретению использует умеренные условия реакции, имеет мало побочных реакций, не требует дополнительной очистки, достигает выхода более чем 90% или даже более чем 95% и подходит для производства с помощью установки реактора непрерывного действия в режиме on-line, в котором легко реализовать автоматический контроль.

**B1**

**039078**

**039078**

**B1**

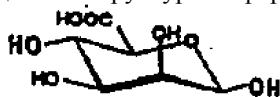
### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новому способу получения олигоманнуриновых дикислот, важных биологически активных веществ. Способ использует промежуточные соединения с М-сегментом в качестве исходных материалов и получает целевые вещества путем стадий кислотной деградации и активного окисления бромноватистой кислотой.

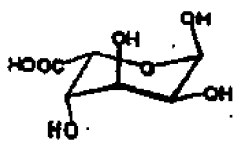
### Уровень техники

Олигоманнуриновые дикислоты привлекают большое внимание из-за своей потенциальной фармацевтической ценности. Олигоманнуриновые дикислоты обычно получают в несколько этапов из альгиновых кислот в качестве исходного сырья.

Молекулы полисахарида исходных альгиновых кислот содержат М-сегменты, образованные из D-маннуриновой кислоты через соединение бета-1,4-гликозидной связи, G-сегменты, образованные из L-гулуриновой кислоты через соединение альфа-1,4-связи гликозидной, и MG-сегменты, образованные гибридизацией двух сахаридов. Их структурные формулы приведены ниже.



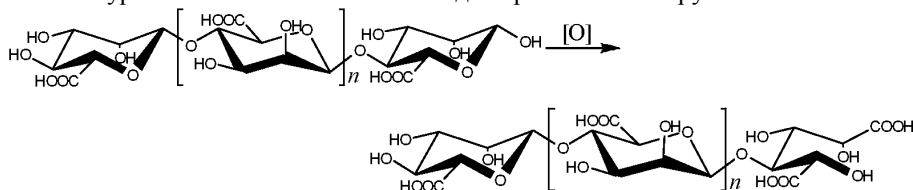
(M; бета-D-маннуриновая кислота)



(G; альфа-L-гулуриновая кислота).

М-сегменты и G-сегменты могут быть выделены из исходных альгиновых кислот. Типичный метод описывается следующим образом: альгиновые кислоты предварительно расщепляют с образованием смешанных полисахаридов полиманнуриновых кислот и полигулуриновых кислот; затем смешанные полисахариды осаждают кислотным способом для удаления из них полигулуриновых кислот и дополнительно очищают для получения гомополиманнуриновых кислот с чистотой более 90% (далее называемых "промежуточными соединениями с М-сегментом"). Ссылка может быть сделана на способы раскрытые, например, в заявке на патент Китая № 98806637.8 и CN02823707.2.

В заявке на патент Китая 200580009396.5 и патенте США US8835403B2 на имя Geng Meiyu и др. раскрыто, что производные олигоманнуринов, маннуриновые дикислоты, имеют важные фармацевтические ценности. Процесс реакции для маннуриновых дикислот может быть проиллюстрирован следующей схемой (I). То есть альдегидная группа в положении C1 маннуриновой кислоты на восстанавливающем конце олигоманнуриновой кислоты окисляется до карбоксильной группы.



Во время вышеуказанного окисления используемые окислители включают раствор сульфата щелочной меди, то есть раствор Фелинга, как в патенте США US 8835403. В частности, в щелочных условиях реакционный субстрат олигоманнуриновых кислот добавляют в раствор сульфата меди для реакции на кипящей водяной бане в течение от 15 мин до 2 ч. В таком способе ион  $\text{Cu}^{2+}$  используется в качестве окислителя для окисления альдегидной группы, и в ходе реакции образуется осадок оксида меди кирпично-красного цвета. Эта реакция обычно используется для идентификации восстанавливающих сахаридов.

Реакция окисления глюкозы до глюконовой кислоты аналогична. Эти реакции можно разделить на три типа. Первый тип относится к биологической ферментации или ферментативному окислению, включая ферментацию путем, например, *Aspergillus niger*, описанную в патенте Китая 96119169.4, ферментацию микроорганизмами для получения глюконовой кислоты, описанную в патентах США 5962286, 5017485 и 5190869, и метод глюкозооксидазы, описанный, например, в патентах США 6942997, 5897995 и 3935071. Второй тип относится к катализируемому тяжелыми металлами окислению: катализируемое палладием окисление для получения глюконовой кислоты, как описано в патентах США 5132452 и 4843173. Третий тип относится к химическим реагентам: окисление глюкозы перекисью водорода с получением глюконовой кислоты, как описано в патенте Китая № 2011103384029.

Тем не менее, существуют некоторые недостатки в вышеуказанных методах. Например, длительный период производства и высокая стоимость биологической ферментации и ферментативной катализации; легкая дезактивация катализаторов на основе тяжелых металлов и простое введение остатков тяжелых металлов; потребность в высокой температуре около  $100^\circ\text{C}$  для реакции гидроксида меди или пере-

киси водорода, многих побочных реакциях и низкого выхода (<50%).

### **Сущность изобретения**

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при использовании специфических окислителей выход реакции значительно улучшается, скорость реакции с образованием олигоманнуроновых дикислот является высокой, а побочных реакций немного. Реакция может быть прекращена путем добавления достаточного количества метанола или этанола в продукт реакции и получения маслянистого осадка. Маслянистое вещество выделяют с помощью делительной воронки и сушат. Если очистка необходима для удаления моносахаридов, солей и примесей органических кислот, это может быть достигнуто дополнительно с помощью диализа или колоночной хроматографии с простыми операциями.

Изобретение, в частности, относится к способу получения олигоманнуроновых дикислот путем окисления промежуточных соединений с М-сегментом в качестве сырья. В частности, промежуточные соединения с М-сегментом деградируют с образованием олигосахаридов с М-сегментом (также называемых здесь "олигоманнуроновыми кислотами"), которые затем превращаются в олигоманнуроновые дикислоты путем окисления бромсодержащим соединением в качестве окислителя, который может функционировать как бромноватистая кислота, такие как водный раствор брома или активный гипобромит.

Первый аспект изобретения относится к способу получения олигоманнуроновых дикислот, включающему стадию реакции окисления при контактировании олигоманнуроновых кислот с бромсодержащим окислителем. В частности, бромсодержащий окислитель по изобретению выбран из группы, состоящей из водного раствора брома, жидкого брома, бромноватистой кислоты (гипобромной кислоты), гипобромита, комбинации источника ионов брома с гипохлоритом и комбинации брома с гипохлоритом. Эти окислители функционируют под действием иона брома или иона гипобромита. В варианте осуществления изобретения молярное количество бромсодержащего окислителя, в пересчете на бромноватистую кислоту и/или гипохлорит, составляет 1,0-2,0-кратное количество от реакционного исходного сырья олигоманнуроновой кислоты.

Другой аспект изобретения относится к применению окислителя, который действует через ионы брома или ионы гипобромита ( $\text{BrO}^-$ ) при окислении восстанавливающих олигосахаридов или полисахаридов.

Способ получения олигоманнуроновых дикислот согласно изобретению может использовать умеренные условия реакции, иметь мало побочных реакций, не требует дополнительной очистки и может достигать выхода более чем 90% или даже более чем 95%. Реакция окисления по настоящему изобретению имеет быструю скорость и высокий выход, может протекать при комнатной температуре и подходит для производства с помощью установки реактора непрерывного действия в режиме on-line, в котором легко реализовать автоматический контроль. Выбранные окислители экономически эффективны, просты в обращении и подходят для крупномасштабного производства.

### **Краткое описание фигур**

На фиг. 1 показана спектроскопия ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$ -ЯМР) промежуточных соединений с М-сегментом исходного сырья по изобретению.

На фиг. 2 показан график SEC-HPLC (эсклюзивная ВЭЖХ), полученных олигоманнуроновых дикислот от окисления водным раствором брома.

На фиг. 3 показан график SEC-HPLC полученных олигоманнуроновых дикислот в результате окисления жидким бромом.

На фиг. 4 показан график SEC-HPLC полученных олигоманнуроновых дикислот в результате окисления с помощью  $\text{NaBrO}$ .

На фиг. 5 показан график SEC-HPLC полученных олигоманнуроновых дикислот в результате окисления гипохлоритом натрия, катализируемого бромидом натрия.

На фиг. 6 показан график SEC-HPLC полученных олигоманнуроновых дикислот в результате окисления бром - гипохлоритом натрия.

На фиг. 7А и 7В показаны соответственно кривые LC-MS гексаозных компонентов маннуроновой кислоты до и после окисления (с водным раствором брома - гипохлоридом натрия).

### **Подробное описание изобретения**

Используемый в настоящем описании термин "около" относится к тому, что он попадает в диапазон  $\pm 5\%$  от значения, модифицированного этим термином, и, в предпочтительном варианте, попадает в диапазон  $\pm 3\%$  от значения, модифицированного этим термином, и в более предпочтительном варианте находится в пределах  $\pm 1\%$  от значения, модифицированного термином.

Получение промежуточных продуктов с М-сегментом.

Исходные промежуточные соединения с М-сегментом, используемые в изобретении, могут быть получены способами, известными из предшествующего уровня техники, например, способами, раскрытыми в заявке на патент Китая № 98806637.8 и CN02823707.2. Эти методы могут быть просто описаны следующим образом: альгиновые кислоты предварительно расщепляются с образованием смешанных полисахаридов полиманнуроновых кислот и полигулуруновых кислот; затем смешанные полисахариды осаждают кислотным способом для удаления из них полигулуруновых кислот и дополнительно очищают

для получения гомополиманнуоновых кислот с чистотой более 90%.

В одном варианте осуществления исходное вещество с олигоманнуоновыми кислотами содержит 2-20 единиц маннуоновой кислоты, предпочтительно 2-15, 2-13, 3-12, 4-10 или 4-8 единиц маннуоновой кислоты.

Промежуточные соединения с М-сегментом, полученные этим способом, имеют молекулярную массу около 10 кДа, и структуры проверены с помощью спектра Н ЯМР (<sup>1</sup>Н-ЯМР), как показано на фиг. 1. В конкретном варианте осуществления изобретения имеется только один концевой сигнал протона около значения химического сдвига 4,5 м.д. (ppm) в спектре Н ЯМР, который определен для <sup>1</sup>Н в положении С1 маннуоновой кислоты; и есть 4 водородных сигнала между 3,5 ppm - 3,9 ppm, которые определены для четырех <sup>1</sup>Н сигналов на С2-С5. Полученные таким образом промежуточные соединения с М-сегментом могут быть непосредственно использованы для следующей стадии реакции.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения промежуточные соединения с М-сегментом, подходящие для изобретения, имеют чистоту более чем 60%, предпочтительно более чем 70%, более предпочтительно более чем 80% и диапазон молекулярных масс 1-15 кДа, предпочтительно 2-12 кДа и более предпочтительно 4-10 кДа.

#### Приготовление олигосахаридов с М-сегментом

Промежуточные соединения с М-сегментом используют в качестве исходного сырья для кислотной деградации для получения окисляемых олигосахаридов с М-сегментом. Промежуточные соединения с М-сегментом растворяют в воде и составляют в виде концентрированного раствора с концентрацией более чем 15% (вес/объем), а затем подвергают кислотной деградации. Предпочтительно составленный раствор имеет концентрацию более чем 20% (вес/объем), более предпочтительно более чем 25% (вес/объем).

После этого рН раствора доводят до кислотного, предпочтительно ниже 5, более предпочтительно ниже 4 и наиболее предпочтительно ниже 3,5. Раствор подвергают деградации при высокой температуре и высоком давлении и естественным образом охлаждают до комнатной температуры.

В одном варианте осуществления полиманнуоновая кислота имеет степень полимеризации 20 или более чем 20.

Кислотную деградацию проводят в условиях высокой температуры и высокого давления. Температура составляет 95-150°C, предпочтительно 100-130°C и более предпочтительно 105-120°C. Давление составляет 0,10-0,50 МПа, предпочтительно 0,10-0,28 МПа и более предпочтительно 0,15-0,20 МПа.

Раствор после деградации концентрируют, выпаривают и сушат до получения безводных твердых веществ.

Олигосахариды с М-сегментом включают смесь дисахаридов с тридекасахаридами, где в расчете на массу смеси дисахаридов с тридекасахаридами дисахариды с тетрасахаридами составляют примерно 40-60%, предпочтительно 50%; пентасахариды и декасахариды составляют около 30-50%, предпочтительно 40%; ундекасахариды к тридекасахаридам составляют около 5-15%, предпочтительно около 10%.

#### Стадия окисления активным гипобромитом

Безводные олигосахариды с М-сегментом, полученные на предыдущей стадии, окисляют, чтобы получить олигоманнуоновые дикислоты согласно изобретению. Окислитель, используемый на этой стадии, представляет собой бромсодержащий окислитель. В частности, этот бромсодержащий окислитель выбирают из группы, состоящей из водного раствора брома, жидкого брома, бромноватистой кислоты, гипобромита, комбинации источника ионов бромидов с гипохлоритом и комбинации брома с гипохлоритом. Поскольку гипобромит или ион гипобромита нестабильны, гипобромит, используемый в способе согласно изобретению, может быть получен *in situ* в реакционной системе или приготовлен на месте перед его добавлением в реакционный раствор. В одном варианте осуществления получение *in situ* достигается реакцией брома с водным щелочным раствором. Водный щелочной раствор представляет собой водный раствор гидроксида щелочного металла, или фосфата щелочного металла, или карбоната щелочного металла, такого как водный раствор гидроксида натрия, или фосфата натрия, или карбоната натрия.

В варианте осуществления изобретения водный раствор брома или жидкий бром используют в качестве окислителя. Водный раствор брома в качестве коммерчески доступного продукта доступен от поставщиков. Обычно коммерчески доступный водный раствор брома имеет концентрацию 3%.



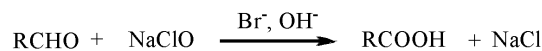
В варианте осуществления изобретения гипобромит используется в качестве окислителя. Гипобромит может быть гипобромитом натрия и/или гипобромитом калия. Гипобромит получают *in situ* путем добавления жидкого брома и щелочи в реакционную среду. Например, его готовят из смеси жидкого брома и NaOH или KOH.

Принимая гипобромит натрия в качестве примера, химические схемы реакций окисления, проводимых таким образом, являются следующими.

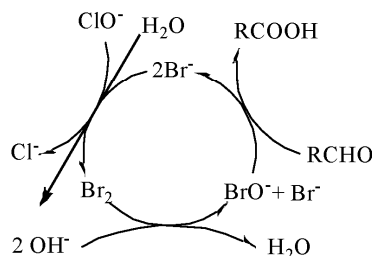


В другом варианте осуществления изобретения гипобромит может быть получен *in situ* с развитием

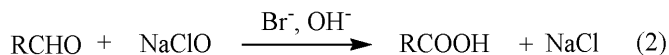
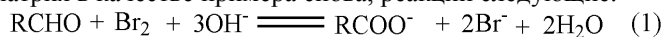
реакции из бромида металла с гипохлоритом натрия или гипохлоритом калия. Во время реакции реакционный раствор обесцвечивается, и затем постепенно появляется красновато-коричневый цвет, что указывает на образование  $\text{Br}_2$ . Цвет постепенно исчезает с ходом реакции. Принимая гипохлорит натрия в качестве примера, химические схемы реакций окисления, проводимых таким образом, являются следующими.



Механизм реакции



Альтернативно, в другом варианте осуществления изобретения гипобромит может быть получен *in situ* путем взаимодействия водного раствора брома с гипохлоритом натрия или гипохлоритом калия. Принимая гипохлорит натрия в качестве примера снова, реакции следующие.



В приведенном варианте осуществления изобретения добавленный бром окисляет часть исходного сырья олигоманнуриновых кислот и генерирует бромид-ионы; в свою очередь, бромид-ионы могут катализировать гипохлорит натрия для непрерывной реакции с непрореагировавшим сырьем до тех пор, пока реакция не завершится.

Стадия окисления по изобретению проводится при pH 6-10, предпочтительно 6,5-9,6, более предпочтительно 7,5-9,5. Стадия окисления по изобретению проводится при температуре предпочтительно 0-70°C, более предпочтительно 10-45°C.

Приготовленные таким образом олигоманнуриновые дикислоты могут быть очищены. Например, спирты, такие как этанол или метанол, могут быть использованы для осаждения. Затем осадок подвергается повторному растворению и вторичному осаждению из спирта. Масляный осадок выделяют с помощью делительной воронки. Масляный осадок сушат с получением желаемых олигоманнуриновых дикислот. Если очистка необходима для дальнейшего удаления остаточных моносахаридов, органических кислотных примесей и неорганических солей в продукте, это может быть достигнуто с помощью мембранного диализа или колоночной хроматографии. Эти операции известны специалистам в данной области. Приведенные ниже примеры иллюстрируют некоторые варианты его осуществления.

Другой аспект изобретения предусматривает использование окислителя, который действует за счет ионов брома или гипобромит-ионами ( $\text{BrO}^-$ ) при окислении восстанавливающих олигосахаридов или полисахаридов, где окислитель выбран из группы, состоящей из водного раствора брома, жидкого брома, смеси, которая производит гипобромит *in situ*, сочетания бромида металла с гипохлоритом и сочетания брома с гипохлоритом натрия.

В одном варианте осуществления изобретения, альдегидная группа или полуацеталь в положении C1 сахаридного кольца на восстанавливаемом конце восстанавливающего олигосахаридов или полисахарида окисляется до карбоксильной группы с образованием соответствующей сахаристой кислоты или сахаристой дикислоты. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий олигосахарид или полисахарид выбран из группы, состоящей из полиманнуриновой кислоты и полигулуриновой кислоты и предпочтительно полиманнуриновой кислоты.

Преимущества изобретения дополнительно проиллюстрированы в неограничивающих примерах ниже. Однако следует понимать, что конкретные материалы и их количества, а также другие экспериментальные условия, используемые в примерах, не являются ограничениями для изобретения. Если не указано иное, части, соотношения, проценты и т.д. в изобретении являются весовыми.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1.

Стадия 1). Получение олигосахаридов с M-сегментом.

1500 г промежуточных соединений с M-сегментом взвешивали и растворяли в дистиллированной воде для приготовления раствора объемом 7500 мл. Показатель pH раствора доводили до 3,5 концентрированной соляной кислотой, разделяли на несколько частей, помещали в автоклав для нагревания при 110°C в течение 3,5 ч, охлаждали и удаляли, концентрировали в роторном испарителе и сушили в вакуумной печи при 60°C с получением 1515 г олигосахаридов с M-сегментом.

Олигосахариды с М-сегментом были качественно проанализированы с помощью ВЭЖХ-МС. Условия ВЭЖХ: хроматографическая колонка, Waters ACQUITY UPLC BEH125 SEC 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм; подвижная фаза: 50 мМ NH<sub>4</sub>Ac, растворенного в 20% метанол-вода, скорость потока 0,1 мл/мин; концентрация образца: 1 мг/мл; объем впрыска: 8 мкл; температура колонного инкубатора: 30°C; детектор: детектор DAD, 210 нм. Условия MS: Agilent 6540 QTOF; источник ионов: ESI; напряжение фрагментации: 120 В; анионный режим.

Все олигосахаридные продукты с М-сегментом, полученные кислотной деградацией расщеплением кислотой, представляли собой все олигоманнуроновые кислоты, которые в основном представляли собой дисахариды и тридекасахариды. МС анализ дисахаридов на тридекасахариды показан в левой половине таблицы ниже.

Стадия 2). Приготовление олигоманнуроновых дикислот

100 г вышеуказанных безводных олигосахаридов с М-сегментом помещали в аналитический стакан объемом 5 л, растворяли в 1 л дистиллированной воды, добавляли 1 л 1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и доводили до pH 8,0 концентрированной соляной кислотой. 3,3 л коммерчески доступного 3% водного раствора брома медленно добавляли при перемешивании при комнатной температуре (20°C) в течение 10 мин. Реакционную смесь непрерывно перемешивали в течение 2 ч до завершения.

Раствор после реакции выливали в пластиковое ведро, содержащее 4 л 95% этанола, и оставляли на 1 ч после осторожного перемешивания. После отстаивания и отслоения супернатант удаляли и нижний слой обезвоживали путем добавления подходящего количества 95% этанола. Темно-желтое маслянистое вещество в нижнем слое собирали и сушили при пониженном давлении в вакуумной печи (60°C) в течение 12 ч с получением высушенных продуктов окисления, которые представляли собой 125 г олигоманнуроновых дикислот. Небольшое количество сухих олигоманнуроновых дикислот удаляли и точно взвешивали до 5,0 г, затем растворяли добавлением воды для приготовления 10% раствора. Раствор обессоливали путем диализа с использованием диализного мешка от границы отсечки по молекулярной массе задерживаемых компонентов от 1000 Да и моносахарид также удаляли. После обессоливания его концентрировали и сушили, а его вес составлял 3,8 г. При расчете исходя из сырья для реакции окисления 100 г олигосахаридов с М-сегментом выход олигоманнуроновых дикислот после обессоливания и сушки составил 95,0%.

Вышеуказанные продукты после обессоливания и сушки были качественно проанализированы с помощью ВЭЖХ-МС. Условия ВЭЖХ: хроматографическая колонка, Waters ACQUITY UPLC BEH125 SEC 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм; подвижная фаза: 50 мМ NH<sub>4</sub>Ac, растворенный в 20% метанол/вода, скорость потока 0,1 мл/мин; концентрация образца: 1 мг/мл; объем впрыска: 8 мкл; температура колонного инкубатора: 30°C; детектор: детектор DAD, 210 нм. Условия MS: Agilent 6540 QTOF; источник ионов: ESI; напряжение фрагментации: 120 В; анионный режим. Завершенность реакции окисления была выше 95%, и никаких дополнительных побочных реакций не происходило. Операция обессоливания удаляла большинство моносахаридов и несколько дисахаридов. МС анализ дисахаридов до тридекасахаридов продуктов окисления, олигоманнуроновых дикислот, показан в правой половине таблицы ниже.

МС анализ олигоманнуроновых кислот и продуктов их окисления

Олигоманнуроновые кислоты	m/z	Назначение сигнала	Олигоманнуроновые дикислоты	m/z	Назначение сигнала
Дисахариды	739.14	[2M-H] <sup>-</sup>	Дисахариды	771.14	[2M-H] <sup>-</sup>
	369.07	[M-H] <sup>-</sup>		385.07	[M-H] <sup>-</sup>
Трисахариды	545.10	[M-H] <sup>-</sup>	Трисахариды	561.10	[M-H] <sup>-</sup>
				280.05	[M-2H] <sup>2-</sup>
Тетрасахариды	721.13	[M-H] <sup>-</sup>	Тетрасахариды	737.12	[M-H] <sup>-</sup>
	360.06	[M-2H] <sup>2-</sup>		368.06	[M-2H] <sup>2-</sup>
Пентасахариды	897.17	[M-H] <sup>-</sup>	Пентасахариды	913.15	[M-H] <sup>-</sup>
	448.08	[M-2H] <sup>2-</sup>		456.07	[M-2H] <sup>2-</sup>
Гексасахариды	1073.20	[M-H] <sup>-</sup>	Гексасахариды	1089.21	[M-H] <sup>-</sup>
	536.09	[M-2H] <sup>2-</sup>		544.10	[M-2H] <sup>2-</sup>
Гептасахариды	1249.23	[M-H] <sup>-</sup>	Гептасахариды	1265.21	[M-H] <sup>-</sup>
	624.11	[M-2H] <sup>2-</sup>		632.10	[M-2H] <sup>2-</sup>
Октасахариды	712.13	[M-2H] <sup>2-</sup>	Октасахариды	1441.28	[M-H] <sup>-</sup>
				720.14	[M-2H] <sup>2-</sup>
Нонасахариды	1601.97	[M-H] <sup>-</sup>	Нонасахариды	1617.30	[M-H] <sup>-</sup>
	800.14	[M-2H] <sup>2-</sup>		808.15	[M-2H] <sup>2-</sup>
				538.43	[M-3H] <sup>3-</sup>
Декасахариды	888.16	[M-2H] <sup>2-</sup>	Декасахариды	896.17	[M-2H] <sup>2-</sup>
				597.11	[M-3H] <sup>3-</sup>
Ундекасахариды	976.17	[M-2H] <sup>2-</sup>	Ундекасахариды	984.19	[M-2H] <sup>2-</sup>
	650.45	[M-3H] <sup>3-</sup>		655.79	[M-3H] <sup>3-</sup>
Додекасахариды	1064.69	[M-2H] <sup>2-</sup>	Додекасахариды	1072.20	[M-2H] <sup>2-</sup>
	709.13	[M-3H] <sup>3-</sup>		714.47	[M-3H] <sup>3-</sup>
				535.60	[M-4H] <sup>4-</sup>
Тридекасахариды	1152.70	[M-2H] <sup>2-</sup>	Тридекасахариды	1160.72	[M-2H] <sup>2-</sup>
	768.14	[M-3H] <sup>3-</sup>		773.15	[M-3H] <sup>3-</sup>
				579.61	[M-4H] <sup>4-</sup>

## Пример 2.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, помещали в аналитический стакан объемом 5 л, растворяли в 1 л дистиллированной воды, добавляли 1 л 1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 6,5 концентрированной соляной кислотой, нагревали до 40°C, на водяной бане и перемешивали. В течение 10 мин медленно добавляли 1,7 л коммерчески доступного 3% водного раствора брома. После непрерывного перемешивания в течение 3 ч реакцию прекращали, добавляя 2-кратный объем 95% этанола, и продукты осаждали. Осадок растворяли в подходящем количестве воды и операцию осаждения спиртом повторяли один раз. Наконец, осадок сушили в вакуумной печи с получением 96 г коричневого кирпичного твердого вещества с выходом около 96%. Состав твердого вещества анализировали с помощью ВЭЖХ-МС в тех же экспериментальных условиях, что и в примере 1. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 2А.

## Пример 3.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, помещали в аналитический стакан объемом 5 л, растворяли в 1 л дистиллированной воды, добавляли 1 л 1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 9,5 концентрированной соляной кислотой, охлаждали до 10°C на водяной бане, добавляя подходящее количество льда, и перемешивали. В течение 10 мин медленно добавляли 4,7 л коммерчески доступного 3% водного раствора брома. После непрерывного перемешивания в течение 1 ч реакцию прекращали, добавляя 2-кратный объем 95% этанола и продукты осаждали. Осадок растворяли в подходящем количестве воды и операцию осаждения спиртом повторяли один раз. Наконец, осадок сушили в вакуумной печи с получением 94 г коричневого кирпичного твердого вещества с выходом около 94%. Состав твердого вещества анализировали с помощью ВЭЖХ-МС в тех же экспериментальных условиях, что и в примере 1. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 2В.

## Пример 4.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 8,0 соляной кислотой, перемешивали на бане с ледяной водой для охлаждения и медленно добавляли 100 г (около 35 мл) жидкого брома (имеется в продаже, содержание >99%). Хотя жидкий бром добавляли по каплям, добавляли подходящее количество 6 М NaOH. Показатель pH реакционного раствора проверяли с помощью индикаторной pH-бумаги и контролировали, чтобы он составлял от 7 до 9. После завершения добавления жидкого брома по каплям, баню с ледяной водой удаляли. После перемешивания при комнатной температуре (23°C) в течение 1,5 ч реакцию прекращали добавлением 2-кратного объема 95% этанола и продукты осаждали. Осадок растворяли в подходящем количестве воды и операцию осаждения спиртом повторяли один раз. Наконец, осадок сушили в

вакуумной печи с получением 97 г коричнево-кирпичного твердого вещества с выходом около 97%. Состав твердого вещества анализировали с помощью ВЭЖХ-МС в тех же экспериментальных условиях, что и в примере 1. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 3А.

Пример 5.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , доводили до pH 6,5 соляной кислотой, перемешивали на ледяной бане для охлаждения и медленно добавляли 60 г (около 20 мл) жидкого брома (имеется в продаже, содержание >99%). Хотя жидкий бром добавляли по каплям, добавляли подходящее количество 6 М NaOH. Показатель pH реакционного раствора проверяли с помощью индикаторной pH-бумаги и контролировали, чтобы он составлял от 7 до 9. После завершения добавления жидкого брома по каплям баню с ледяной водой удаляли. После нагревания на водяной бане до 40°C и перемешивания в течение 3 ч реакцию прекращали добавлением 2-кратного объема 95% этанола и продукты осаждали. Осадок растворяли в подходящем количестве воды и операцию осаждения спиртом повторяли один раз. Наконец, осадок сушили в вакуумной печи с получением 94 г коричнево-кирпичного твердого вещества с выходом около 94%. Состав твердого вещества анализировали с помощью ВЭЖХ-МС в тех же экспериментальных условиях, что и в примере 1. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 3В.

Пример 6.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , доводили до pH 9,5 соляной кислотой, перемешивали на ледяной бане для охлаждения и медленно добавляли 150 г (около 50 мл) жидкого брома (имеется в продаже, содержание >99%). Хотя жидкий бром добавляли по каплям, добавляли подходящее количество 6 М NaOH. Показатель pH реакционного раствора проверяли с помощью индикаторной pH-бумаги и контролировали, чтобы он составлял от 7 до 9. После завершения добавления жидкого брома по каплям баню с ледяной водой удаляли. Подходящее количество льда добавляли в водяную баню так, чтобы температура достигала 10°C после того как лед растаял, и лед добавляли в любое время, когда это необходимо, так чтобы температура поддерживалась на уровне 10°C. После перемешивания в течение 1 ч реакцию останавливали добавлением 2-кратного объема 95% этанола и продукты осаждали. Осадок растворяли в подходящем количестве воды и операцию осаждения спиртом повторяли один раз. Наконец, осадок сушили в вакуумной печи с получением 93 г коричнево-кирпичного твердого вещества с выходом около 93%. Состав твердого вещества анализировали с помощью ВЭЖХ-МС в тех же экспериментальных условиях, что и в примере 1. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 3С.

Пример 7.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и доводили до pH 8,0 соляной кислотой с получением раствора олигосахарида с М-сегментом. Готовили 100 мл раствора 6 М NaOH и охлаждали на ледяной бане. Жидкий бром также предварительно охлаждали на ледяной бане. После реакции раствор NaOH подвергали взаимодействию с жидким бромом с образованием гипобромита натрия, а затем гипобромит натрия приводили во взаимодействие с олигосахаридами с М-сегментом.

Поскольку гипобромит натрия не был стабильным, его необходимо было приготовить непосредственно перед использованием. Таким образом, было применено устройство с реактором непрерывного действия on-line: устройство реактора включало реактор смешения А, снабженный охлаждающим элементом, и реактор смешения В, с объемами 50 мл и 100 мл, соответственно, предварительно заполненные дистиллированной водой; раствор NaOH и жидкий бром раздельно, вручную и непрерывно закачивали через пластиковые шприцы с постоянными скоростями 5 мл/мин и 1 мл/мин, соответственно, в то время как охлаждающую жидкость при -10°C пропускали через конденсационную трубку реактора А; после того, как раствор NaOH и жидкий бром прореагировали в реакторе смешения А в течение некоторого периода времени, полученный NaBrO вышел из реактора А и поступил в реактор В для реакции с раствором олигосахарида с М-сегментом (скорость потока 10 мл/мин), перекачиваемого в реактор В при комнатной температуре. Полученные олигоманнуроновые дикислоты вытекли из смешительного реактора В со скоростью 16 мл/мин. Эффлюент собирали в химический стакан, содержащий 800 мл 95% этанола.

После завершения реакции желтовато-коричневый маслянистый осадок в нижнем слое в стакане собирали, снова подвергая операции осаждения спиртом после того, как его растворили в подходящем количестве воды, и сушили при пониженном давлении в вакуумной печи (60°C, 12 ч), чтобы получить 90 г коричневого твердого вещества с выходом около 90%. Небольшое количество сухого продукта брали для анализа ВЭЖХ-МС. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 4А.

Пример 8.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и доводили до pH 6,5 соляной кислотой. Готовили 100 мл 6М раствора NaOH и охлаждали на ледяной бане. Жидкий бром также предварительно охлаждали на ледяной бане. Для проведения реакции раствор NaOH приводили во взаимодействие с жидким бромом с образованием гипобромита натрия, который затем реагировал с олигосахаридами с М-сегментом.



Устройство реактора было таким же, как в примере 7. Скорости потока, при которых раствор NaOH и жидкий бром вводили в реактор А, составляли 3 мл/мин и 0,6 мл/мин, соответственно; скорость потока раствора олигосахаридов с М-сегментом в реакторе В составляла 10 мл/мин. Реакцию контролировали за счет водяной бани до температуры 40°C. Продукт олигоманнуриновых дикислот вытекал из смешительного реактора В со скоростью 14 мл/мин. Эффлюент собирали в химический стакан, содержащий 800 мл 95% этанола. После завершения реакции желтовато-коричневый маслянистый осадок в нижнем слое в стакане собирали и снова подвергали операции осаждения спиртом после того, как его растворили в подходящем количестве воды. Наконец, осадок сушили при пониженном давлении в вакуумной печи (60°C, 12 ч) с получением 93 г коричневого твердого вещества с выходом около 93%. Небольшое количество сухого продукта брали для анализа ВЭЖХ-МС. Результаты анализа SEC-HPLC показаны на фиг. 4В.

#### Пример 9.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и доводили до pH 9,5 соляной кислотой с получением раствора олигосахаридов с М-сегментом. Готовили 100 мл раствора 6М NaOH и охлаждали на ледяной бане. Жидкий бром также предварительно охлаждали на ледяной бане. Для проведения реакции раствор NaOH предварительно реагировал с жидким бромом с образованием гипобромита натрия, который затем приводили во взаимодействие с олигосахаридами с М-сегментом.

Устройство реактора было таким же, как в примере 7. Скорости потока, при которых раствор NaOH и жидкий бром вводили в реактор А, составляли 7,5 мл/мин и 1,5 мл/мин, соответственно; скорость потока раствора олигосахаридов с М-сегментом в реакторе В составляла 10 мл/мин. Реакцию контролировали так, чтобы она имела температуру 10°C. Продуктовые олигоманнуриновые дикислоты вытекли из реактора смешения В со скоростью 19 мл/мин. Эффлюент собирали в химический стакан, содержащий 800 мл 95% этанола. После завершения реакции желтовато-коричневый маслянистый осадок в нижнем слое в стакане собирали и снова подвергали операции осаждения спиртом после того, как его растворили в подходящем количестве воды. Наконец, осадок сушили при пониженном давлении в вакуумной печи (60°C, 12 ч) с получением 94 г коричневого твердого вещества с выходом около 94%. Небольшое количество сухого продукта брали для анализа ВЭЖХ-МС. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 4С.

#### Пример 10.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 7,5 соляной кислотой, добавляли 20 г бромида натрия при перемешивании до растворения и добавляли по каплям 50 мл натрия гипохлорита (коммерчески доступен, в виде 13% раствора) при комнатной температуре (18°C). Реакционный раствор побледнел, а затем постепенно появлялся красновато-коричневый цвет. Цвет поблек после того, как реакция продолжалась в течение определенного периода времени. После того как реакция протекала в течение 3 ч, цвет стал оранжево-желтым.

Реакционный раствор выливали в химический стакан, содержащий 600 мл 95% этанола, равномерно перемешивали и оставляли для наслоения. Жидкость нижнего слоя растворяли в подходящем количестве воды, повторно осаждали, используя 2-кратный объем 95% этанола, и сушили при пониженном давлении в вакуумной печи при 60°C в течение 12 ч. 97 г коричневого твердого вещества получали после сушки с выходом около 97%. Небольшое количество было взято для анализа ВЭЖХ-МС. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 5А.

#### Пример 11.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 6,5 соляной кислотой, добавляли 20 г бромида натрия при перемешивании до полного растворения и по каплям добавляли 25 мл натрия гипохлорита (коммерчески доступный в виде 13% раствора) при 40°C. Реакционный раствор побледнел, а затем постепенно появлялся красновато-коричневый цвет. Цвет поблек после того, как реакция продолжалась в течение определенного периода времени. После того как реакция протекала в течение 3 ч, цвет стал оранжево-желтым. Реакционный раствор выливали в химический стакан, содержащий 600 мл 95% этанола, равномерно перемешивали и оставляли для наслоения. Жидкость нижнего слоя растворяли в подходящем количестве воды, повторно осаждали, используя 2-кратный объем 95% этанола, и сушили при пониженном давлении в вакуумной печи при 60°C в течение 12 ч. После сушки получали 90 г коричневого твердого вещества с выходом около 90%. Небольшое количество было взято для анализа ВЭЖХ-МС. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 5В.

#### Пример 12.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 9,5 соляной кислотой, добавляли 20 г бромида натрия при перемешивании до растворения и по каплям добавляли 75 мл натрия гипохлорита (коммерчески доступный 13% раствор) при 40°C. Реакционный раствор поблек, а затем постепенно появлялся красновато-коричневый цвет. Цвет поблек после того, как реакция продолжалась в течение определенного периода времени. После того как реакция протекала в течение 1 ч, цвет стал оранжево-желтым. Реакционный раствор выливали в химический стакан, содержащий 600 мл 95% этанола, равномерно перемешивали и оставляли для

наслоения. Жидкость нижнего слоя растворяли в подходящем количестве воды, повторно осаждали, используя 2-кратный объем 95% этанола, и сушили при пониженном давлении в вакуумной печи при 60°C в течение 12 ч. 96 г коричневого твердого вещества получали после сушки с выходом около 96%. Небольшое количество было взято для анализа ВЭЖХ-МС. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 5С.

Пример 13.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 8,5 соляной кислотой, добавляли по каплям 10 мл жидкого брома при перемешивании при комнатной температуре. После этого к реакционной смеси дополнительно добавляли 35 мл гипохлорита натрия (коммерчески доступный, в виде 13% раствора). Реакция протекала в течение 1 ч. После того, как реакция была завершена, реакцию прекращали, добавляя 2-кратный объем 95% этанола, и оставляли для наслоения. Желто-коричневый маслянистый осадок в нижнем слое снова подвергали операции осаждения спиртом после того, как его растворили в подходящем количестве воды. Наконец, осадок сушили при пониженном давлении в вакуумной печи с получением 91 г твердого вещества с выходом около 91%. Небольшое количество образца было взято для анализа ВЭЖХ-МС. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 6А.

Пример 14.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 6,5 соляной кислотой, нагревали до 40°C на водяной бане, по каплям добавляли с помощью 8 мл жидкого брома при перемешивании. После этого в реакционную смесь дополнительно добавляли 20 мл гипохлорита натрия (коммерчески доступный, с концентрацией 13%). Реакция протекала в течение 3 ч. Добавленный бром окислял часть исходных олигоманнуриновых кислот и генерировал ионы брома; в свою очередь, бромид-ионы катализировали гипохлорит натрия, чтобы непрерывно реагировать с непрореагировавшим сырьем, пока реакция не будет завершена. После того, как реакция была завершена, реакцию прекращали, добавляя 2-кратный объем 95% этанола, и оставляли для наслоения. Желто-коричневый маслянистый осадок в нижнем слое снова подвергали операции осаждения спиртом после того, как его растворили в подходящем количестве воды. Наконец, осадок сушили при пониженном давлении в вакуумной печи с получением 96 г с выходом около 96%. Небольшое количество образца было взято для анализа ВЭЖХ-МС. Результаты анализа SEC-HPLC показаны на фиг. 6В.

Пример 15.

100 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в 500 мл буферного раствора 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 9,5 соляной кислотой, в то время как температуру контролировали до 10°C, добавляя лед на водяной бане, добавляя по каплям 15 мл жидкого брома при перемешивании. После этого к реакционной смеси дополнительно добавляли 50 мл гипохлорита натрия (коммерчески доступный, с концентрацией 13%). Реакция протекала в течение 0,5 ч. Добавленный бром окислял часть исходных олигоманнуриновых кислот и генерировал ионы брома; в свою очередь, бромид-ионы катализировали гипохлорит натрия, чтобы непрерывно реагировать с непрореагировавшим сырьем, пока реакция не будет завершена. После того, как реакция была завершена, реакцию прекращали, добавляя 2-кратный объем 95% этанола, и оставляли для наслоения. Желто-коричневый маслянистый осадок в нижнем слое снова подвергали операции осаждения спиртом после того, как его растворили в подходящем количестве воды. Наконец, осадок сушили при пониженном давлении в вакуумной печи с получением 94 г твердого вещества с выходом около 94%. Небольшое количество образца было взято для анализа ВЭЖХ-МС. Результат анализа SEC-ВЭЖХ показан на фиг. 6С.

Пример 16.

10 г олигосахаридов с М-сегментом, полученных в примере 1, растворяли в воде для приготовления 0,1 г/мл, выделяли с использованием гель-хроматографической колонки Bio-Gel P6, элюировали 0,02 М NaCl, детектировали при УФ 210 нм и собирали с помощью автоматического устройства для сбора фракций. Те же самые компоненты объединяли, обессоливали с использованием гель-хроматографической колонки Bio-Gel P10 и сушили с получением 10 олигосахаридных компонентов. Один олигосахаридный компонент из них был отмечен как НехаМ. НехаМ анализировали с помощью ВЭЖХ-МС, чтобы показать, что он содержит в основном гексасахариды олигоманнуриновой кислоты, в то время как существует небольшое количество пентасахаридов и гептасахаридов. См. фиг. 7А для деталей.

Взвешивали 0,5 г вышеуказанного НехаМ, растворяли в 5 мл воды, переносили в 50 мл круглодонную колбу, добавляли 5 мл 1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, доводили до pH 7,9 с помощью 6 М HCl, выдерживали при комнатной температуре 20°C, перемешивали с магнитной мешалкой, по каплям добавляли 1,0 мл коммерчески доступного водного раствора брома с 3%-ной концентрацией и перемешивали в течение 30 мин, добавляли по каплям 0,5 мл гипохлорита натрия (коммерческий, с концентрацией 13%) и перемешивают в течение 1 ч, добавляли 10 мл 95% этанол для прекращения реакции и образования осадка. Осадок повторно растворяли в 10 мл воды и снова осаждали, добавляя этанол. Супернатант удаляли пипеткой, осадок собирали и сушили в вакуумной печи при 60°C с получением 0,48 г твердого вещества. Подходящее количество твердого вещества отбирали для анализа методом ВЭЖХ-МС - тем же методом анализа, что и в примере 1. Результат анализа показывает, что основные компоненты исходного сырья

реакции, гексасахариды маннуроной кислоты, были окислены до гексасахаридов маннуроной дикислоты с полнотой реакции >98%. Результат анализа LC-MS показан на фиг. 7В.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения олигоманнуроновых дикислот, включающий стадию реакции окисления, при которой олигоманнуроновые кислоты контактируют с бромсодержащим окислителем; где бромсодержащий окислитель выбирают из группы, состоящей из водного раствора брома, жидкого брома, гипобромной кислоты, гипобромита, комбинации источника ионов бромидов с гипохлоритом и комбинации брома с гипохлоритом; где температура реакции окисления составляет 10-40°C и pH реакции окисления регулируют в диапазоне от 6,5 до 9,5.

2. Способ по п.1, в котором молярное количество бромсодержащего окислителя, рассчитанное на основе гипобромной кислоты и/или гипохлорита, составляет 1,0-2,0-кратное количество от реакционного исходного сырья олигоманнуроной кислоты.

3. Способ по п.1, в котором гипобромную кислоту или гипобромит получают производством *in situ*.

4. Способ по п.3, в котором получение *in situ* достигается реакцией брома с водным щелочным раствором.

5. Способ по п.4, в котором водный щелочной раствор представляет собой водный раствор гидроксида щелочного металла, или фосфата щелочного металла, или карбоната щелочного металла, такого как водный раствор гидроксида натрия, или фосфата натрия, или карбоната натрия.

6. Способ по п.1, в котором гипобромит или гипохлорит представляет собой соль щелочного металла, такую как натриевая соль или калиевая соль.

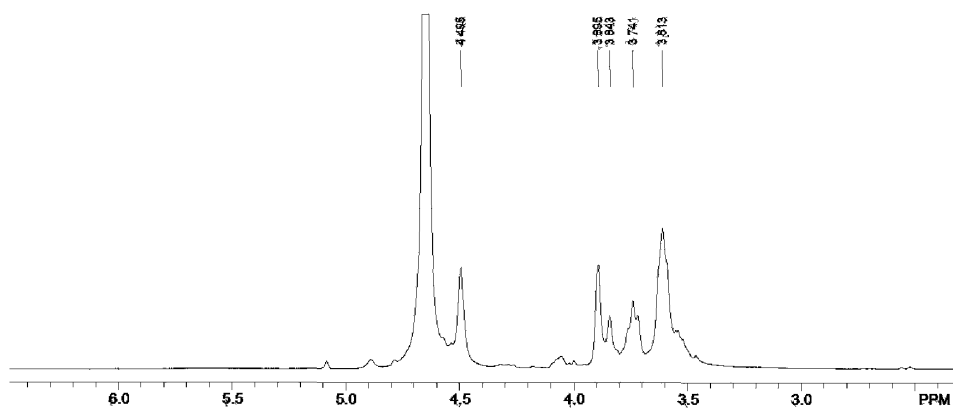
7. Способ по любому из пп.1-6, в котором исходное вещество с олигоманнуроновыми кислотами содержит 2-20 единиц маннуроной кислоты, предпочтительно 2-15, 2-13, 3-12, 4-10 или 4-8 единиц маннуроной кислоты.

8. Способ по п.7, в котором олигоманнуроновые кислоты получают деградацией полиманнуроной кислоты с более высокой степенью полимеризации.

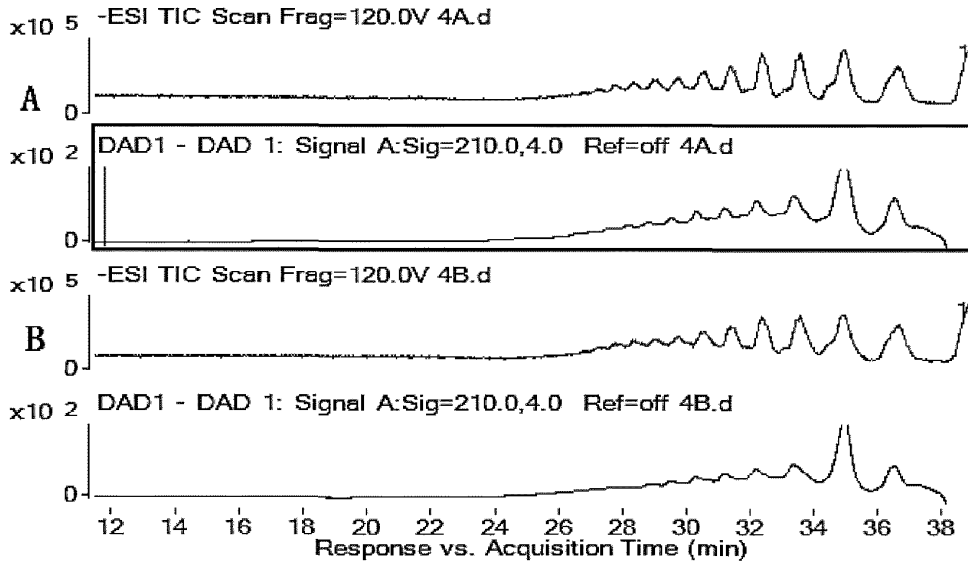
9. Способ по п.8, в котором деградация представляет собой деградацию в кислых условиях.

10. Способ по п.9, в котором полиманнуроновую кислоту приготавливают в виде концентрированного раствора с концентрацией более, чем 15% (вес/объем) и pH, доведенного до уровня ниже 5,0, чтобы обеспечить деградацию полиманнуроной кислоты.

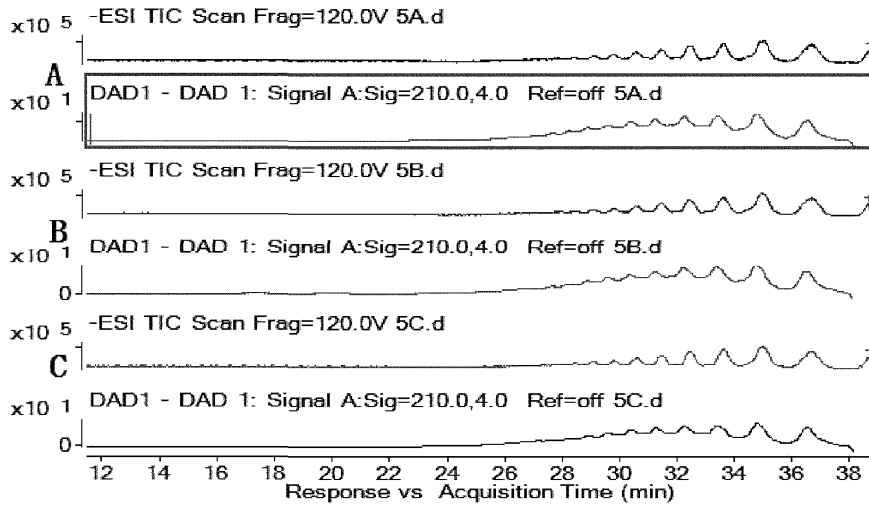
11. Способ по любому из пп.8-10, в котором полиманнуроновая кислота имеет степень полимеризации 20 или более чем 20.



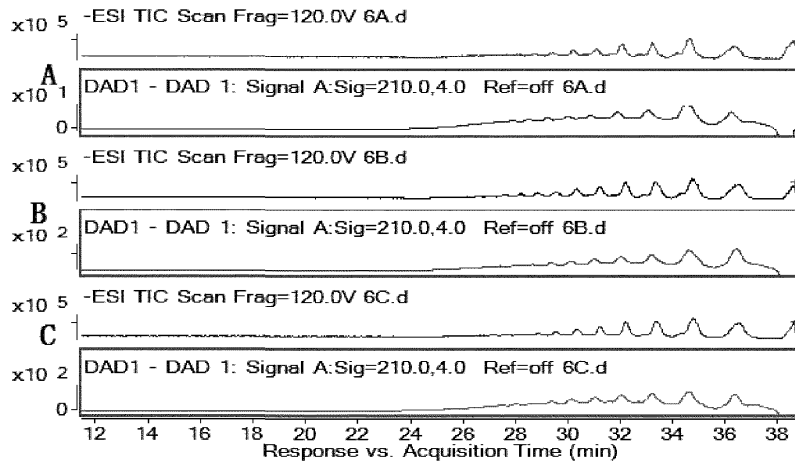
Фиг. 1



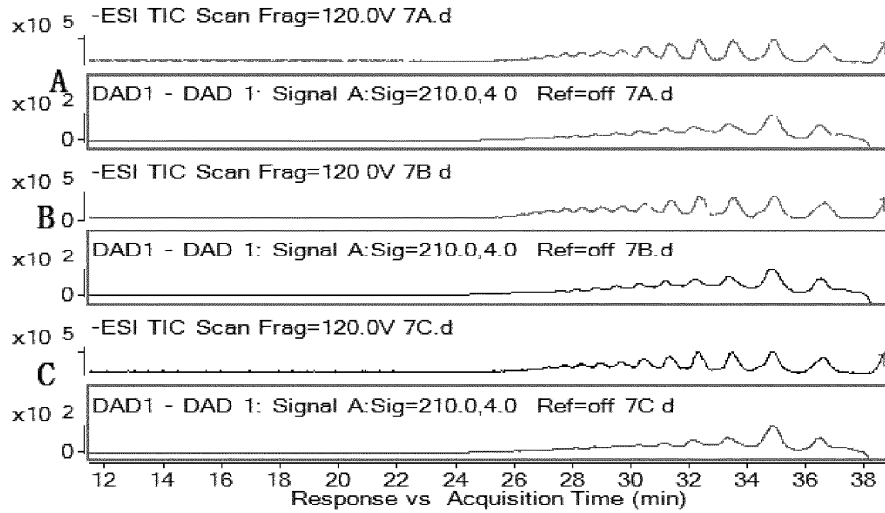
Фиг. 2



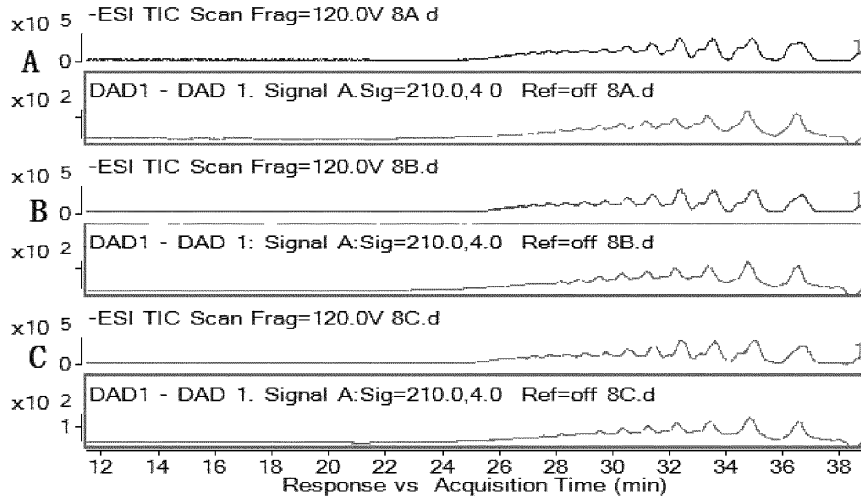
Фиг. 3



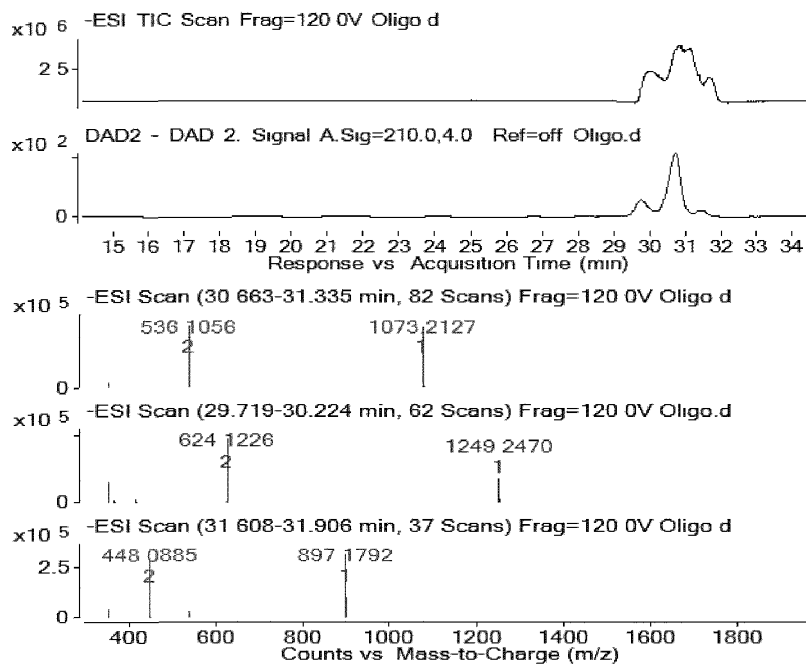
Фиг. 4



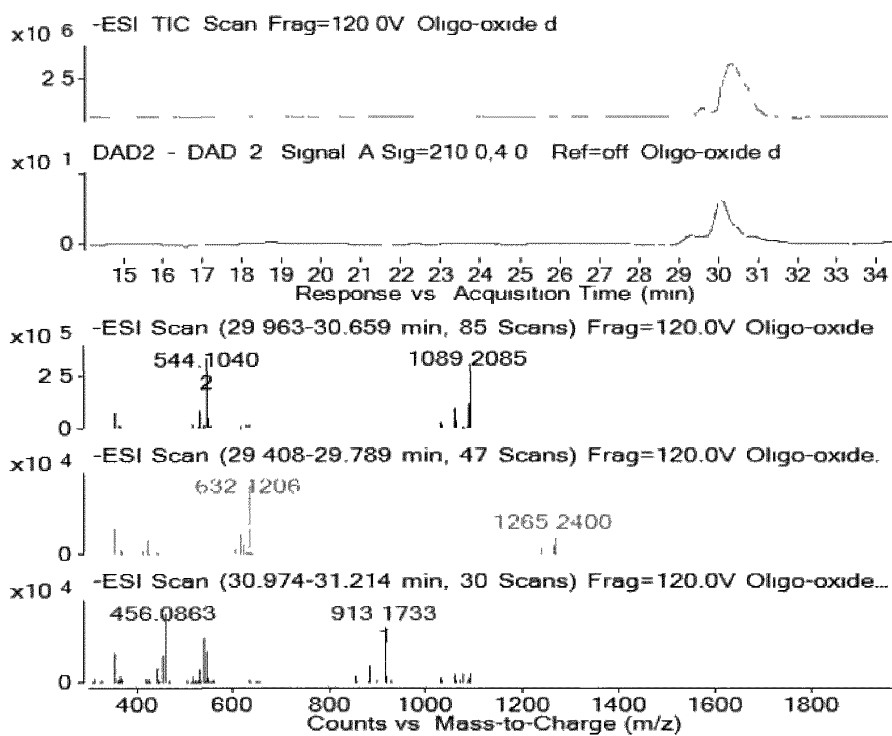
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7A



Фиг. 7В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2