

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292496** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.11.07

(51) Int. Cl. *C08B 37/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.02

(54) **СПОСОБ ПРЯМОГО СУЛЬФАТИРОВАНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМОМ РАСТВОРИТЕЛЕ**

(31) 102020000004564

(72) Изобретатель:

(32) 2020.03.04

**Бацца Паола, Бьянки Давиде,
Тальяни Ауро Роберто (IT)**

(33) IT

(86) PCT/IB2021/051714

(74) Представитель:

(87) WO 2021/176341 2021.09.10

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(71) Заявитель:

ЛЕСАФФР Э КОМПАНИ (FR)

(57) Изобретение относится к новому способу проведения прямого сульфатирования незащищенных сахаров, в частности полисахаридов, с использованием экологически приемлемых растворителей.

202292496

A1

A1

202292496

СПОСОБ ПРЯМОГО СУЛЬФАТИРОВАНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМОМ РАСТВОРИТЕЛЕ

Область техники

Изобретение относится к новому способу сульфатирования, в частности сульфатирования сахаров, с использованием экологически приемлемых растворителей; способ также применим к полисахаридам и позволяет получать сульфатированные гликозаминогликаны, такие как хондроитинсульфат. Реакции этого типа обычно проводят в токсичных растворителях с высоким воздействием на окружающую среду, таких как диметилформамид, диметилацетамид и тому подобное. Ранее неизвестное открытие заключается в том, что реакцию сульфатирования можно проводить в уксусной кислоте - экологически приемлемом растворителе, что приводит к хорошим выходам конверсии, хорошему контролю степени сульфатирования и хорошей хемоселективности. Кроме того, способ не требует стадий введения защиты/снятия защиты гидроксильной группы, а может быть применен непосредственно к незащищенным сахарам. Он также применим к полисахаридам в широком диапазоне молекулярных масс. В частности, он может применяться к гликозаминогликанам и может быть полезен при приготовлении гепарина, кератансульфата, дерматансульфата и хондроитинсульфата.

Уровень техники

Гликозаминогликаны (ГАГ, или мукополисахариды) представляют собой семейство полисахаридов, образованных прямой цепью дисахаридов, в которой чередуются простой сахар с аминсахаром; в дисахариде могут присутствовать одна или более сульфатных групп в различных положениях. Они присутствуют во многих тканях животных и особенно распространены в соединительной ткани, такой как кожа, хрящи и мягкие ткани в целом. К ГАГ относятся гепарин и гепарансульфат, хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат и гиалуроновая кислота; последняя является единственным соединением без сульфатных групп. Гликозаминогликаны могут иметь разные профили сульфатирования и разную молекулярную массу, в зависимости от вида животных и органа или ткани происхождения.

Хондроитинсульфат (ХС) представляет собой гликозаминогликан, состоящий из N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, присутствующий в сульфатных группах в различных положениях в дисахариде, и обычно присутствует в различных тканях животных; он является самым распространенным ГАГ у людей, где он содержится, в

частности, в хрящах. В настоящее время его используют как в качестве инъекционного препарата, так и в качестве нутрицевтического продукта, при лечении остеоартрита и других воспалительных заболеваний суставов, в частности колена и кисти руки, как для человека, так и для ветеринарного использования.

ХС обычно получают в качестве побочного продукта пищевой промышленности, в частности при разведении животных, таких как крупный рогатый скот и свиньи, или в рыбной промышленности, в частности от акул. В зависимости от ткани и вида происхождения хондроитинсульфат имеет разные характеристики, в частности с разным профилем сульфатирования и разной молекулярной массой; на последнюю также может влиять используемый способ приготовления. ХС можно классифицировать на основании последовательности дисахаридов, из которых он состоит; сульфатная группа может присутствовать в разных положениях в дисахаридах и в обоих сахарах (в основном в положениях 2, 4 и 6); хондроитины А и С имеют только одну сульфатную группу, тогда как В, Е и D имеют две сульфатные группы. Также могут присутствовать несульфатированные и трисульфатированные хондроитины.

Состав ХС животного происхождения, присутствующего на рынке, различается в зависимости от видов и тканей происхождения; молекулярная масса также различается, как правило, она выше в продуктах морского происхождения и ниже в продуктах, полученных от земных животных. Более того, ХС животного происхождения представляет собой очень гетерогенную смесь с точки зрения молекулярной массы полимеров, так как состоит из смеси короткоцепных (несколько кДа), среднецепных и длинноцепных (>100 кДа) полисахаридов. Для описания характеристик ХС также указывают его полидисперсность (дисперсия значений MW вокруг среднего) в дополнение к среднему значению MW. Описание композиции по происхождению продукта можно найти в WO2012/159655, стр. 2-3, таблица 1.

Средняя исходная молекулярная масса ХС (или других гликозаминогликанов) также может быть уменьшена по желанию путем контролируемой фрагментации полисахарида; в ХС животного происхождения с низкой средней молекулярной массой (ХС-НММ, LMW-CS) значение полидисперсности, как правило, еще выше, так как полисахаридные цепи фрагментируются статистическим образом как при кислотном, так и при радикальном гидролизе.

В дополнение к плохой стандартизации продукта, тот факт, что ХС имеет животное происхождение, очевидно, также сопряжен с другими рисками, такими как связанные с заболеваниями, передаваемыми от исходного животного к людям или домашним животным.

Для преодоления недостатков, вытекающих из животного происхождения, недавно была разработано производство хондроитинсульфата, получаемого полусинтетическим методом; несulfатированный предшественник, называемый К4, производят путем ферментации и затем превращают в хондроитинсульфат. К4 представляет собой полисахарид, который имеет ту же линейную структуру, что и хондроитин, но также содержит остатки фруктозы и не имеет сульфатных групп; он может быть произведен путем ферментации, например, из *E. coli* O5:K4:H4, как описано в WO2001/02597A1. К4 может быть легко дефруктозилирован химическим гидролизом, приводящим к получению линейного полимера под названием К4d, соответствующего структуре несulfатированного хондроитина, и из него получают ХС.

Альтернативно, полисахарид К4d также может быть произведен непосредственно путем ферментации с использованием подходящего рекомбинантного микробного штамма, как описано в WO2012/004063.

Последующее сульфатирование полисахарида К4d может происходить в контролируемых условиях для изменения степени сульфатирования (числа сульфатных групп на единицу дисахарида) с точки зрения положения введения сульфатной группы, как правило, в положении 4 или 6. Молекулярную массу также можно изменять, например, подвергая высокомолекулярный полимер кислотному или радикальному гидролизу; это может быть сделано либо до, либо после сульфатирования, то есть как с полисахаридом К4d, так и с хондроитинсульфатом. Этот процесс, с его вариантами, приводит к образованию хондроитинсульфата, имеющего желаемый профиль сульфатирования, с превосходной надежностью и без недостатков, характерных для продукта животного происхождения (US2019/231810).

Реакцию сульфатирования полимера К4d до сих пор проводили с применением различных сульфатирующих агентов, но всегда с использованием безводного органического растворителя, в частности диметилформамида (ДМФ); она не является процессом с низким экотоксикологическим воздействием.

ДМФ является растворителем, который требует особых мер предосторожности, поскольку он не только легко воспламеняется, но также опасен для человека и окружающей среды; он токсичен для кожи и глаз, дыхательной системы и репродуктивной системы. Это также особенно опасно, поскольку вредно, если он вступает в контакт с кожей или его вдыхают. С учетом его токсических свойств экологические издержки, очевидно, также высоки; рекуперация и удаление сточных вод, содержащих ДМФ, является дорогостоящей. В качестве альтернативы ДМФ в реакциях сульфатирования могут быть использованы

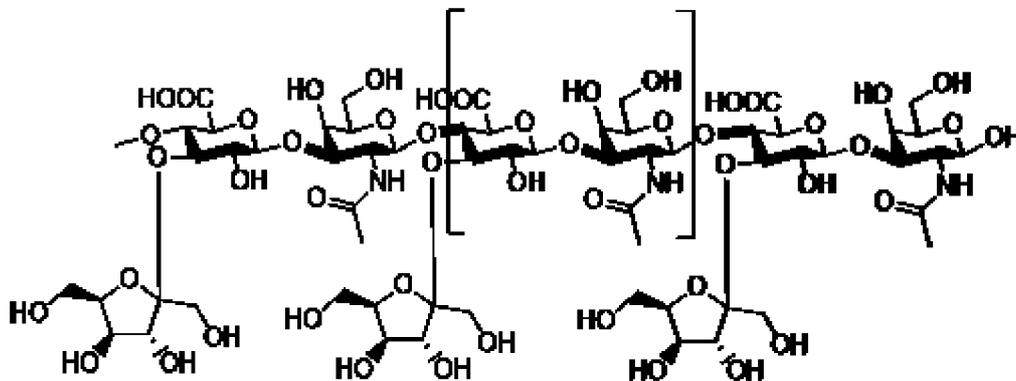
диметилацетамид или N-метилпирролидон, однако они создают аналогичные экотоксикологические проблемы.

ДМФ также является хорошим растворителем для сульфатирующих агентов; например, в Chopin et al., *BioMed Research International* 2015, Article ID508656, гликозаминогликан сульфатируют с использованием ионных жидкостей в качестве реакционного растворителя, но ДМФ по-прежнему используют для растворения доноров сульфатной группы (комплексы SO_3 с различными органическими основаниями). Кроме того, ДМФ образует комплекс с SO_3 , который представляет собой возможный сульфатирующий агент.

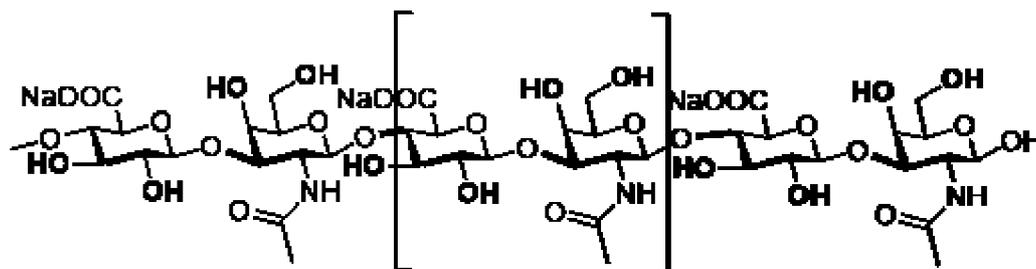
В качестве альтернативы ДМФ в качестве растворителя в реакциях, проводимых с микроволновым излучением, может быть использован ацетонитрил; см., например, de Paz Carrera et al., WO2012/035188. Общее описание реакций сульфатирования органических молекул, включая полисахариды, можно найти в обзоре Desai et al., *Tetrahedron* 66, 2907-18 (2010).

Определения

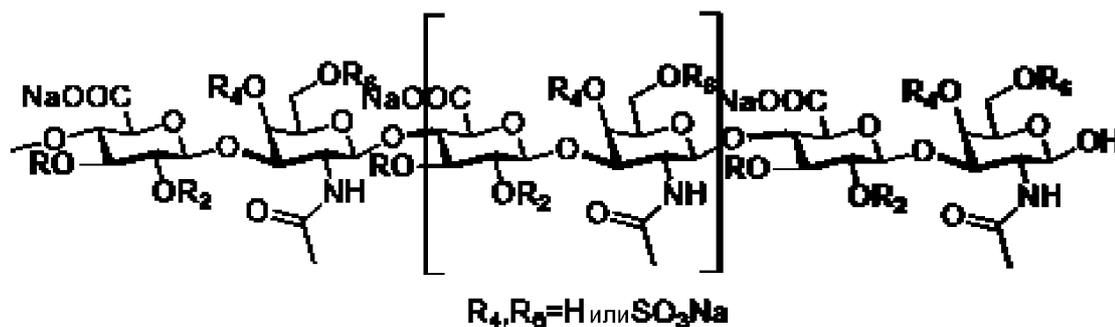
К4: фруктозилированный, несульфатированный гликозаминогликановый полисахарид, имеющий следующую структурную формулу:



К4d: несульфатированный гликозаминогликановый полисахарид, свободный от остатков фруктозы, имеющий следующую структурную формулу:



Хондроитинсульфат: сульфатированный гликозаминогликановый полисахарид, имеющий следующую структурную формулу:



Описание изобретения

Способ сульфатирования согласно изобретению позволяет использовать уксусную кислоту - экологически приемлемый растворитель, сохраняя при этом хороший контроль над реакцией как с точки зрения ее прохождения, то есть степени сульфатирования, так и положения введения сульфатной группы, а именно ее селективности. Кроме того, способ не требует стадий введения защиты и снятия защиты, что приводит к экономии сырья и снижению количества сточных вод. Способ включает увеличение молекулярной массы (MW), которое связано исключительно с введением новых сульфатных групп, но не влияет на длину полимера или влияет на него только контролируемым образом и, в частности, не вызывает фрагментацию; если требуется получить ХС-НММ (LMW-CS), MW конечного продукта может быть соответственно изменена по желанию путем объединения процессов синтеза (контролируемая фрагментация полисахарида К4d до или после сульфатирования на хондроитинсульфате) и процессов выделения (выделение осаждением или ультрафильтрацией). Таким образом, новый процесс обеспечивает получение ХС с желаемым профилем сульфатирования, молекулярной массой и полидисперсностью, который подходит для использования в пищевой и фармацевтической областях.

Способ согласно изобретению оказывает меньшее экологическое воздействие благодаря использованию экологически чистых растворителей и снижению объема производства сточных вод. В предпочтительном воплощении способа полученный продукт представляет собой натриевую соль низкомолекулярного хондроитинсульфата.

В одном возможном воплощении сульфатируют полимерную соль К4d, предпочтительно тетраалкиламмониевую соль, более предпочтительно пиридиниевую соль либо тетраметил-, тетраэтил- или тетрабутиламмониевую соль. В альтернативном воплощении используют полисахарид К4d в кислой форме.

В одном воплощении в качестве сульфатирующего агента используют комплекс SO_3 с органическим основанием, такой как SO_3Py или SO_3NEt_3 , ДМФ и т.д. В альтернативном воплощении в качестве сульфатирующего агента используют хлорсульфоновую кислоту.

В одном воплощении реакцию сульфатирования проводят с использованием уксусной кислоты в качестве растворителя.

Способ согласно изобретению включает:

- a) растворение или суспендирование полисахарида, такого как гликозаминогликан или его соль, в уксусной кислоте,
- b) добавление сульфатирующего агента,
- c) проведение реакции в контролируемых температурных условиях, например, путем поддержания реакционной смеси между температурой замерзания уксусной кислоты или ее смесей с полисахаридами, подлежащими сульфатированию, и 70°C, более предпочтительно между 10 и 50°C и еще более предпочтительно между 10 и 20°C,
- d) отделение продукта от реакционного растворителя, например, путем прямой фильтрации, осаждения в органическом растворителе или хроматографии,
- e) возможно, удаление органических или неорганических солей и других примесей из раствора гликозаминогликансульфата, например, путем диализа,
- f) возможно, извлечение реакционного растворителя, получаемого после отделения желаемого продукта, и повторное использование его в реакции, описанной в пункте a).

Таким образом, раствор желаемого продукта получают в достаточно чистом виде для использования в области питания; если желательно получить продукт в твердой форме, раствор может быть подвергнут сублимационной сушке, распылительной сушке или высушен другим подходящим способом.

Если необходимо получить продукт реакции с качеством, пригодным для использования в инъекциях, рекомендуется удалить из вышеуказанного раствора любые пирогены, например, путем депирогенизации с помощью углерода с последующей стерилизующей фильтрацией перед сушкой.

Полный процесс начинается с производства капсульного полисахарида K4, полученного путем ферментации штамма *Escherichia coli* дикого типа O5:K4:H4, как описано в WO2001/02597A1. После разделения биомассы надосадочную жидкость подвергают гидролизу в контролируемых условиях для удаления остатков фруктозы; получают водный раствор полисахарида K4d, который соответствует несульфатированному хондроитину. Указанный продукт можно дополнительно очистить для получения водного раствора дефруктозилированного высокомолекулярного полисахарида в виде натриевой соли. Затем этот продукт подвергают контролируемой фрагментации в кислых условиях, аналогично процессу, описанному Cho et al. в *Biol Pharm Bull* 27, (1), 47-51. Альтернативно, может быть использован процесс радикальной фрагментации с использованием перекиси водорода и сульфата железа, как раскрыто в IT

1224260, или с использованием гипохлорита натрия, как раскрыто в US 4977250. Реакцию обычно контролируют с помощью эксклюзионной ВЭЖХ (HPLC-SEC) для контроля молекулярной массы продукта; при достижении желаемой средней MW, например, между 5 и 30 кДа, реакцию останавливают путем добавления гидроксида натрия, карбоната натрия или другого основания до достижения нейтрального pH и охлаждения смеси до комнатной температуры.

Водный раствор низкомолекулярного полимера K4d подвергают ультрафильтрации полисульфовыми мембранами с отсечкой от 500 до 5000 Дальтон; в пермеате удаляют неорганические соли (в основном хлорид натрия и сульфат натрия) и сахара с очень низкой молекулярной массой. Таким образом, молекулярную массу полимера выбирают в узком диапазоне; можно также комбинировать две ультрафильтрации, одну с более высокой отсечкой, и другую с более низкой отсечкой, чтобы еще больше сузить молекулярно-массовое распределение (низкая полидисперсность).

Фракция высокомолекулярного полимера, задержанная мембраной, может быть переработана в следующей партии.

Для получения полисахарида K4d в виде натриевой соли раствор можно концентрировать путем ультрафильтрации или тонкопленочного выпаривания, а затем высушить распылением; альтернативно, продукт может быть выделен путем сублимационной сушки. Получают по существу чистый полисахарид K4d (несульфатированный хондроитин), имеющий желаемую молекулярную массу; остаточное содержание воды составляет менее 5% и обычно менее 2% (титрование по Карлу Фишеру).

Используя процедуру, очень похожую на описанную выше, можно получить калиевую, аммониевую или другую соль, используя соответствующие растворы для диализа или элюирования из смол (например, используя раствор KCl вместо NaCl).

Для получения полимера K4d в кислой форме или в виде четвертичной аммониевой соли можно действовать так, как описано выше, но для снижения затрат предпочтительно использовать катионообменную смолу, предпочтительно сильнокислотную смолу, и предпочтительно сульфоновую кислотную смолу. Смола может быть основана на природном полимере, таком как агароза, или на синтетическом полимере, таком как полиакрилат или полистирол; она может быть как жесткой, так и в форме геля; она должна быть функционализирована сильнокислотной группой, такой как сульфоновая или фосфорная группа. Процесс можно проводить в колоночном или периодическом режиме, и количество используемой смолы зависит от степени ее функционализации (количество функциональных групп на литр смолы).

Водный раствор полимера K4d обрабатывают в реакторе, снабженном механической мешалкой, путем добавления смолы (в кислой форме) последовательными порциями до тех пор, пока pH раствора не составит менее 2; затем смолу отделяют фильтрацией. Получают раствор полисахарида K4d в виде недиссоциированной кислоты, при этом фрагментации полимера не наблюдают; продукт также может быть получен в твердом виде путем сублимационной сушки или распылительной сушки раствора.

Если продукт должен быть получен в виде четвертичной аммониевой соли, к описанному выше раствору кислоты добавляют подходящее основание (пиридин, гидроксид тетрабутиламмония и т.д.) в количестве, необходимом для достижения нейтрального pH; твердый продукт получают путем распылительной сушки, как описано выше, или путем сублимационной сушки.

Таким путем могут быть получены пиридиновые, тетраметиламмониевые, тетраэтиламмониевые и тетрабутиламмониевые соли, все в виде белого или бледно-желтого твердого вещества, с остаточной влажностью менее 5% и по существу свободные от натрия (менее 0,1%).

Полимер K4d в кислотной или солеобразной форме затем используют для реакции сульфатирования, описанной ниже, для получения хондроитинсульфата; после диализа и концентрирования раствор ХС сушат распылением для получения натриевой соли ХС. Хороший контроль реакции позволяет изменять региоселективность и степень сульфатирования полимера. Таким образом, можно приготовить продукт, имеющий характеристики, сходные с характеристиками хондроитинсульфата животного происхождения, например, с профилем сульфатирования, сходным с ХС, полученным из акул или других видов животных.

Также можно выбрать среднюю молекулярную массу конечного продукта и его распределение вокруг среднего значения либо путем фрагментации полимера K4d перед сульфатированием, как описано выше, либо путем фрагментации хондроитинсульфата, полученного после сульфатирования; в обоих случаях фрагментация может быть осуществлена с помощью кислотного или радикального механизма, как описано в цитируемой литературе.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение более подробно.

Пример 1: общий метод получения натриевой соли полимера K4d

Полисахарид K4d получают путем приготовления капсульного полисахарида K4 посредством ферментации *Escherichia coli*, как описано в Manzoni et al., *Biotechnol Lett* 18, 383-6 (1996); после разделения биомассы надосадочную жидкость подвергают гидролизу в контролируемых условиях для удаления остатков фруктозы; полученный водный раствор

полисахарида K4d дополнительно очищают с помощью хроматографии, как описано в Rodriguez et al., *Eur J Biochem* 177, 117-124 (1988), для получения водного раствора дефруктозилированного высокомолекулярного полисахарида.

Затем проводят кислотную деполимеризацию в контролируемых условиях, регулируя раствор до достижения pH в диапазоне от 1 до 4 путем добавления HCl и нагрева до 60-80°C. Реакцию контролируют с помощью эксклюзионной ВЭЖХ (HPLC-SEC) для проверки молекулярной массы продукта; при достижении желаемой средней молекулярной массы от 5 до 30 кДа реакцию останавливают добавлением гидроксида натрия до достижения pH 7 и охлаждают до 20-25°C.

Водный раствор низкомолекулярного полимера K4d подвергают ультрафильтрации полисульфоновыми мембранами, имеющими отсечку 2,5 кДа, диализируют водой и концентрируют. В промышленных масштабах продукт выделяют распылительной сушкой, в то время как в лабораторных масштабах его получают сублимационной сушкой. Натриевую соль полисахарида K4d (несульфатированный хондроитин) получают в виде мелкодисперсного беловатого порошка; остаточное содержание воды менее 2% (титрование по Карлу Фишеру).

Пример 2: общий метод получения четвертичной аммониевой соли полимера K4d

Полисахарид K4d получают, действуя так, как описано в примере 1, до получения водного раствора чистой натриевой соли с желаемой молекулярной массой без необходимости выделения продукта в твердой форме.

Указанный раствор помещают в реактор, снабженный механической мешалкой, и затем добавляют смолу Amberlite IRA1200H (кислотная форма) последовательными порциями до тех пор, пока не будет достигнут pH ниже 2; затем смолу отделяют фильтрацией. Получают раствор полисахарида K4d в недиссоциированной кислотной форме, фрагментации полимера не наблюдают; продукт также может быть получен в твердом виде путем сублимационной сушки или распылительной сушки раствора.

Вместо Amberlite IRA1200H может быть использована аналогичная смола, например, сильнокатионная смола с полиакриловой или поливинильной структурой, и будут получены аналогичные результаты.

К указанному раствору кислоты добавляют основание (пиридин или гидроксид тетрабутил-, тетраметил- или тетраэтиламмония) в количестве, необходимом для достижения значения pH более 7. Твердый продукт получают методом распылительной сушки или сублимационной сушки.

Таким образом получают пиридиновые, тетраметиламмониевые, тетраэтиламмониевые или тетрабутиламмониевые соли, все в виде белого или бледно-

желтого твердого вещества, с остаточной влажностью менее 5% и по существу свободные от натрия (менее 0,1%).

Пример 3: альтернативная методика получения полимера K4d

В качестве альтернативы способу, описанному в примере 1, полисахарид K4d может быть получен непосредственно путем ферментации с использованием штамма DSM23644, который производит дефруктозилированный полисахарид. Продукт очищают, как описано в WO2012/004063, и выполняют кислотную или радикальную деполимеризацию, как описано *Cho et al.*, для получения желаемой молекулярной массы.

Полученный продукт идентичен полученному согласно примеру 1; четвертичную аммониевую соль можно получить, действуя так, как описано в примере 2.

Пример 4 (сравнительный): получение хондроитинсульфата в растворителе ДМФ

Реакцию проводят так, как описано в WO2012/159655, пример 4, с той разницей, что используемый полисахарид K4d имеет более низкую молекулярную массу, <10 кДа.

В реактор загружают 72 мл безводного диметилформамида и 1,20 г тетрабутиламмониевой (ТБА) соли полисахарида K4d, полученной, как описано в примере 2. Добавляют 3 эквивалента комплекса SO₃ ДМФ, и температуру поддерживают на уровне примерно +10°C. После завершения реакции реакцию останавливают бикарбонатом натрия и осуществляют диализ, с выделением продукта путем сублимационной сушки; получают хондроитинсульфат натрия с молекулярной массой <10 кДа и профилем сульфатирования, представленным в WO2012/159655, стр. 16, таблица 2.

Пример 5: получение сульфатирующей смеси в уксусной кислоте

В стеклянный реактор загружают в потоке азота 134 мл безводного ДМФ и охлаждают до 5±5°C; добавляют по каплям 67 г хлорсульфоново́й кислоты, поддерживая температуру <30°C. Во время добавления образуется белый осадок; смесь выдерживают при перемешивании еще 20 минут, регулируя температуру до 5±5°C. Твердое вещество фильтруют через воронку Бюхнера из спеченного стекла в атмосфере азота, удаляя ДМФ. Твердый реагент растворяют в уксусной кислоте (73,46 г) при перемешивании магнитной мешалкой. Полученный сульфатирующий раствор выдерживают в атмосфере азота при 4°C, защищенный от влажности, до момента использования.

Пример 6: получение низкомолекулярного хондроитинсульфата в растворителе - уксусной кислоте

В стеклянный реактор загружают в потоке азота 200 мл безводной уксусной кислоты и 20 г тетрабутиламмониевой соли полисахарида K4d, полученной, как описано в примере 2. Полученную суспензию охлаждают при перемешивании примерно до 13°C, обрабатывают сульфатирующим раствором, приготовленным согласно примеру 5

(40,22 г), и выдерживают при перемешивании при той же температуре в течение 24 часов. Реакцию останавливают 30% NaOH (382 мл) и льдом, поддерживая температуру $<30^{\circ}\text{C}$; суспензию доводят до pH 7,9 с помощью HCl и фильтруют через воронку Бюхнера, и твердое вещество (ацетат натрия) отбрасывают. Маточный раствор подвергают ультрафильтрации через ультрафильтрационную мембрану (отсечка 2,5 кДа), осуществляя диализ с водой. Ретентат концентрируют вакуумным выпариванием, обесцвечивают обесцвечивающим древесным углем и высушивают сублимационной сушкой, с получением 10,5 г хондроитинсульфата.

Пример 7: получение низкомолекулярного хондроитинсульфата в растворителе - уксусной кислоте

В стеклянный реактор загружают в потоке азота 200 мл безводной уксусной кислоты и 20 г тетрабутиламмониевой соли полисахарида K4d, полученной, как описано в примере 2; суспензию охлаждают примерно до 13°C и добавляют сульфатирующий раствор, описанный в примере 5 (40,0 г). Через 24 часа реакцию останавливают водой и льдом, поддерживая температуру $<30^{\circ}\text{C}$; после этого следует ультрафильтрация и диализ с водой, с регулированием pH ретентата между 5,5 и 7,5. Ретентат концентрируют, обесцвечивают древесным углем и высушивают сублимационной сушкой, с получением 11,5 г хондроитинсульфата.

Пример 8: получение низкомолекулярного хондроитинсульфата в растворителе - уксусной кислоте

В стеклянный реактор загружают в потоке азота 800 мл безводной уксусной кислоты и 80 г тетрабутиламмониевой соли полисахарида K4d, полученной, как описано в примере 2. Полученную суспензию нагревают примерно до 50°C при перемешивании, обрабатывают сульфатирующим раствором, приготовленным согласно примеру 5 (161,32 г), и выдерживают при перемешивании при той же температуре в течение 1 часа. Часть суспензии (~200 мл) подвергают остановке реакции путем выливания в воду и лед (2,5 кг), поддерживая температуру $<30^{\circ}\text{C}$; полученный раствор подвергают ультрафильтрации через ультрафильтрационную мембрану (отсечка 2,5 кДа), осуществляя диализ с водой до достижения проводимости в пермеате < 500 мкСм и регулируют pH ретентата в пределах от 5,5 до 7,5. Ретентат концентрируют путем выпаривания, обработки льдом и сублимационной сушки, с получением 8,6 г хондроитинсульфата.

Пример 9: получение низкомолекулярного хондроитинсульфата в растворителе - уксусной кислоте с хлорсульфоновой кислотой

В стеклянный реактор загружают в потоке азота 200 мл безводной уксусной кислоты и 20 г тетрабутиламмониевой соли полисахарида K4d, полученной, как описано в примере

2; суспензию охлаждают примерно до 13°C и добавляют хлорсульфоновую кислоту (8,95 г), поддерживая температуру в течение 24 часов. Затем суспензию выливают в воду и лед, подвергают ультрафильтрации и диализу, как описано в примере 7. Путем сублимационной сушки получают 12,7 г хондроитинсульфата.

Пример 10: получение низкомолекулярного хондроитинсульфата в растворителе - уксусной кислоте с хлорсульфоновой кислотой

В стеклянный реактор, снабженный механической мешалкой, термометром и капельной воронкой, загружают в потоке азота 600 мл безводной уксусной кислоты и 60 г тетрабутиламмониевой соли полисахарида K4d, полученной, как описано в примере 2. Полученную суспензию нагревают примерно до 50°C при перемешивании и обрабатывают хлорсульфоновой кислотой (28,8 г) и выдерживают при перемешивании при той же температуре в течение 10 мин. Часть суспензии (~200 мл) подвергают остановке реакции путем выливания в воду и лед (2,5 кг), поддерживая температуру <30°C; полученный раствор подвергают ультрафильтрации через ультрафильтрационную мембрану, осуществляя диализ с водой до проводимости в пермеате < 500 мкСм и регулируя рН ретентата между 5,5 и 7,5. Ретентат концентрируют путем выпаривания, обработки льдом и сублимационной сушки, с получением 8,64 г хондроитинсульфата.

Пример 11: получение низкомолекулярного хондроитинсульфата в растворителе - уксусной кислоте с хлорсульфоновой кислотой

Процесс проводят, как и в предыдущих примерах, с использованием 200 мл безводной уксусной кислоты, 20 г ТБА соли полисахарида K4d и 10,54 г хлорсульфоновой кислоты, проводя реакцию при 10-15°C в течение 24 часов. После завершения реакции суспензию фильтруют через воронку Бюхнера, и осадок промывают уксусной кислотой и растворяют в воде при рН 7,3 с Na₂CO₃ в достаточном количестве (q.s.). Полученный раствор подвергают ультрафильтрации и диализу, как описано выше, и ретентат подвергают сублимационной сушке с получением 8,58 г хондроитинсульфата.

Пример 12: Очистка низкомолекулярного хондроитинсульфата в уксусной кислоте путем осаждения в этаноле и воде

Синтез проводят, как описано в примере 6, и ацетат натрия удаляют фильтрацией в конце реакции. Раствор добавляют по каплям в абсолютный этанол при энергичном перемешивании; в результате получают суспензию, которую фильтруют через воронку Бюхнера для получения 27,1 г сырого хондроитинсульфата в виде стеклообразного твердого вещества. Аликвоту полученного твердого вещества (2,5 г) растворяют в 0,2М NaCl (7,5 мл), и раствор затем добавляют по каплям в EtOH (50 мл) при энергичном

перемешивании; чистый хондроитинсульфат выпадает в осадок в виде аморфного твердого вещества (2,16 г).

Пример 13: Синтез и очистка высокомолекулярного хондроитинсульфата в уксусной кислоте

Реакцию проводят, как описано в примере 1, с получением высокомолекулярного (дефруктозилированного) полисахарида K4d в водном растворе; однако деполимеризацию не проводят. Соответствующую тетрабутиламмониевую соль получают с ионообменной смолой, как описано в примере 2.

В стеклянный реактор загружают в потоке азота 91 мл безводной уксусной кислоты и 9,1 г ТБА соли высокомолекулярного полисахарида K4d. Полученную суспензию охлаждают при перемешивании до 10-15°C и обрабатывают хлорсульфоновой кислотой (5,3 г), затем выдерживают при перемешивании при той же температуре в течение 2,5 часов. Суспензию фильтруют через воронку Бюхнера, и полученный осадок растворяют в 10% вод. NaHCO₃; полученный раствор подвергают ультрафильтрации и диализу через ультрафильтрационную мембрану. Путем сублимационной сушки получают 5,21 г хондроитинсульфата.

Пример 14: Синтез и очистка низкомолекулярного хондроитинсульфата (с порошком ДМФ-SO₃) в уксусной кислоте

В стеклянный реактор загружают в потоке азота 200 мл безводной уксусной кислоты и 20 г ТБА соли полисахарида K4d, полученной, как описано в примере 2. Полученную суспензию нагревают примерно до 50°C при перемешивании, обрабатывают комплексом ДМФ-SO₃ (Олдрич, 10,95 г) и выдерживают при перемешивании при той же температуре в течение 1 часа; затем реакцию останавливают во льду с последующей ультрафильтрацией и диализом, поддерживая рН ретентата на уровне от 5,5 до 7,5. Продукт обесцвечивают обесцвечивающим древесным углем и подвергают сублимационной сушке, с получением 8,73 г хондроитинсульфата.

Формула изобретения

1. Способ получения гликозаминогликансульфатов путем взаимодействия гликозаминогликанов или их солей с сульфатирующим агентом, отличающийся тем, что реакцию проводят в уксусной кислоте при контролируемых температурных условиях.

2. Способ по.1, в котором сульфатирующим агентом является хлорсульфоновая кислота или комплекс SO_3 с органическим основанием или с диметилформамидом.

3. Способ по.2, в котором органическим основанием является пиридин или триэтиламин.

4. Способ по одному или более из п.п.1-3, в котором температура находится в диапазоне от температуры замерзания реакционной смеси до $70^{\circ}C$, предпочтительно от 10 до $50^{\circ}C$ и более предпочтительно от 10 до $20^{\circ}C$.

5. Способ по одному или более из п.п.1-4, в котором гликозаминогликан находится в форме соли.

6. Способ по.5, в котором соль представляет собой тетраалкиламмониевую или пиридиниевую соль.

7. Способ по одному или более из п.п.1-6, в котором гликозаминогликан выбирают из хондроитинсульфата, гепарина, гепарансульфата, кератансульфата и дерматансульфата.

8. Способ по п.7, в котором гликозаминогликан представляет собой хондроитинсульфат.

9. Способ по одному или более из п.п.1-8 для получения низкомолекулярной натриевой соли хондроитинсульфата.

10. Способ по одному или более из п.п.1-9, в котором продукт сульфатирования выделяют с помощью фильтрации, осаждения в органическом растворителе или хроматографии, возможно после удаления органических или неорганических солей путем диализа.