

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045761**

(13) **B1**

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

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.25 | (51) Int. Cl. <i>A61K 31/702</i> (2006.01)
<i>A61P 25/28</i> (2006.01)
<i>A61P 25/16</i> (2006.01)
<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
<i>A61P 25/04</i> (2006.01)
<i>A61P 3/10</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
202190080 | |
| (22) Дата подачи заявки
2019.06.28 | |

(54) **КОМПОЗИЦИЯ ОЛИГОМЕРНЫХ САХАРНЫХ ДИКИСЛОТ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

- | | |
|---------------------------------------|---------------------|
| (31) 201810721327.6 | (56) CN-A-106344593 |
| (32) 2018.06.29 | CN-A-106344592 |
| (33) CN | CN-A-106344594 |
| (43) 2021.07.20 | CN-A-106344595 |
| (86) PCT/CN2019/093778 | CN-C-100508985 |
| (87) WO 2020/001632 2020.01.02 | |

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ШАНХАЙ ГРИН ВЭЛИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.;**
**ШАНГХАЙ ИНСТИТЮТ ОФ
МАТИРИА МЕДИКА, ЧАЙНИЗ
АКЭДЕМИ ОФ САЙНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:
**Гэн Мэйюй, Чжан Чжэньцин, Цзинь
Иншэнь, Сяо Чжунпин, Дин Цзянь
(CN)**

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

(57) Изобретение относится к композиции олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, которая содержит маннуроновою кислоту, описываемую формулой (IV), или ее фармацевтически приемлемую соль, где n - целое число, выбираемое из чисел от 1 до 9, m выбирают из 0, 1 или 2, m' выбирают из 0 или 1, причем суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, с $n=1-5$ составляет не менее чем 60% общей массы композиции, а суммарная масса гулуруновой кислоты составляет не более чем 50% общей массы композиции.

B1

045761

045761 B1

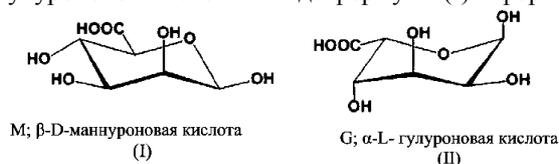
Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к оптимальной композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, созданной методом отбора по биологической активности с использованием модели болезни Альцгеймера на животных для определения влияния степени полимеризации олигосахаридов, получаемых из альгиновой кислоты, и их соотношений на биологическую активность. В итоге проведенного отбора была получена композиция с наилучшей биологической активностью, и искомое вещество было выделено методом мембранной ультрафильтрации.

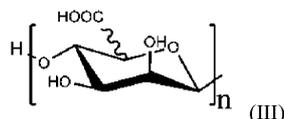
Предпосылки создания изобретения

Олигосахариды альгиновой кислоты привлекают большое внимание возможностями их использования в медицинских целях. Олигосахариды альгиновой кислоты обычно получают из альгиновой кислоты, используемой в качестве сырья, в несколько стадий.

В молекулах олигосахаридов альгиновой кислоты из сырья имеются участки М, образованные молекулами D-маннурановой кислоты, соединенными β -1,4-гликозидными связями; участки G, образованные молекулами L-гулурановой кислоты, соединенными α -1,4-гликозидными связями, и участки MG, образованные гибридизацией этих двух сахаридов. Ниже приведены структурные формулы D-маннурановой кислоты и L-гулурановой кислоты в виде формулы (I) и формулы (II).



Структура олигосахарида, получаемого из альгиновой кислоты, показана ниже формулой (III)

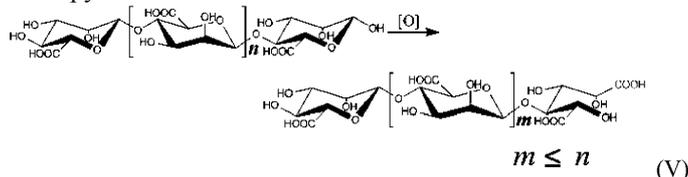


Фрагменты М и G можно выделить из природного сырья - альгиновой кислоты.

Обычный способ может быть упрощенно описан ниже следующим образом: альгиновую кислоту предварительно расщепляют, так что образуется смесь полисахаридов - полиманнурановой и полигулурановой кислот, затем эту смесь подвергают осаждению кислотой, так что из нее удаляется некоторое количество полигулурановой кислоты (См., например, способы, описанные в заявке на патент Китая №№ 98806637.8 и CN 02823707.2).

Одним способом получения олигомерной маннурановой кислоты является следующий: полученный, как описано выше, промежуточный продукт фрагмента М, подвергают дальнейшему ацидолизу путем нагревания в кислой среде, в результате чего получают небольшие фрагменты полимера маннурановой кислоты с желаемой молекулярной массой. Кроме того, эффективность расщепления можно повысить с помощью окислительного расщепления, в частности восстанавливающий конец может быть окислен с образованием разомкнутой кольцевой структуры двухосновной (дикарбоновой) сахарной кислоты (более подробно см. в заявке на патент Китая № 200580009396.5 (№ 1 в списке патентных источников), поданной Meiyu Geng, et al., и в патенте США № 8835403 B2 (№ 2 в списке патентных источников)). Для удобства описания дальнейшие ссылки на патентные источники №№ 1 и 2 обозначают вместе как предшествующие документы, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Реакцию получения маннурановой дикислоты, описанную в предшествующих документах, можно представить уравнением реакции (V), а именно альдегидная группа в положении C1 остатка маннурановой кислоты на восстанавливающем конце полисахарида олигоманнурановой кислоты окисляется с образованием карбоксильной группы.



В упомянутом выше процессе окислительного превращения в качестве окислителя обычно используется щелочной раствор сульфата меди (реактив Фелинга). В предшествующих документах описывается применение этого метода окисления. Говоря более конкретно, продельывают следующее: в щелочной среде к раствору сульфата меди прибавляют субстрат реакции - полиманнурановую кислоту (то есть упомянутый выше промежуточный продукт - фрагмент М) и держат на кипящей водяной бане в течение промежутка времени длительностью от 15 мин до 2 ч. В этом методе ион Cu^{2+} окисляет альдегидную группу, в результате чего образуется оксид меди, выпадающий в виде осадка кирпично-красного цвета. Эта реакция часто используется для определения восстанавливающих сахаров.

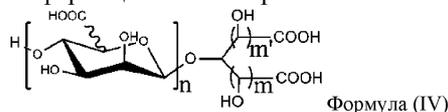
В предшествующих документах описывается, что олигоманнурановые кислоты обладают активно-

стью против болезни Альцгеймера (AD) и сахарного диабета, причем наибольшей активностью обладают олигомеры маннуровой кислоты со степенью полимеризации 6. Патогенез болезни Альцгеймера и сахарного диабета типа II тесно связан с амилоидными белками (β -амилоидом и амилином). Амилоидные белки агрегируют с образованием белковых олигомеров, которые затем агрегируют с образованием волокон. Эти белковые агрегаты цитотоксичны, вызывают в клетках окислительные реакции, ведущие к повреждению митохондрий; и инициируют каскад реакций, таких как воспалительные реакции, и в итоге повреждая множество нейронов и Р-клеток, так что в конце концов развивается болезнь Альцгеймера и диабет типа II. Олигоманнуровые кислоты нацелены на амилоидные белки, тем самым противодействуя каскаду реакций, инициируемому амилоидными белками, что позволяет предотвратить/лечить болезнь Альцгеймера и диабет типа II.

Для того, чтобы получить олигоманнуровую кислоту, обладающую активностью против болезни Альцгеймера и диабета типа II, описанной в предшествующих документах, необходимо из исходного сырья альгиновой кислоты выделить гулуруновую кислоту. В альгиновой кислоте содержится обычно более 30% гулуруновой кислоты, максимум до около 70%. Таким образом, реальные затраты, связанные с получением высокочистой олигоманнуровой кислоты, очень велики.

Раскрытие изобретения

В первом аспекте данное изобретение относится к композиции получаемых из альгиновой кислоты олигомерных сахарных дикислот, включающих маннуруновую кислоту, описываемую формулой (IV), и/или гулуруновую кислоту, или их фармацевтически приемлемые соли



где n - целое число, выбираемое из чисел от 1 до 9,

m выбирают из 0, 1 или 2,

m' выбирают из 0 или 1,

и где суммарная масса получаемых из альгиновой кислоты олигомерных сахарных дикислот с $n=1-5$ составляет не менее чем 60% общей массы композиции, а суммарная масса гулуруновых дикислот составляет не более чем 50% общей массы композиции.

В другом аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции или медицинскому продукту, которые содержат указанную выше композицию получаемых из альгиновой кислоты олигомерных сахарных кислот. В других аспектах данное изобретение относится также к применению указанной композиции получаемых из альгиновой кислоты олигомерных сахарных кислот при лечении заболеваний, выбираемых из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, воспалительных заболеваний, боли, сахарного диабета или сосудистой деменции.

В частности, композиция олигомерных сахарных кислот, получаемых из альгиновой кислоты, по данному изобретению является смесью маннуруновой и гулуруновой кислот с различными степенями полимеризации, причем основными компонентами являются олигосахариды со степенью полимеризации от 2 до 10, а именно: участок М альгиновой кислоты, образованный остатками маннуруновой кислоты, соединенными β -1,4-гликозидными связями; участок G альгиновой кислоты, образованный остатками гулуруновой кислоты, соединенными α -1,4-гликозидными связями; участок MG альгиновой кислоты, образованный гибридизацией указанных двух сахаридов. Известно, что маннуруновые дикислоты обладают некоторой фармакологической активностью в отношении болезни Альцгеймера и сахарного диабета. Наиболее активными в этом отношении сахарами являются пента-, гекса-, гепта- и октасахариды, особенно гексасахариды. Однако авторы данного изобретения обнаружили, что смесь маннуруновых и гулуруновых кислот со степенями полимеризации от 2 до 10 также обладает фармакологической активностью в отношении болезни Альцгеймера и сахарного диабета, причем важно контролировать, чтобы содержание гулуруновых кислот находилось в определенном диапазоне. Иными словами, композиция получаемых из альгиновой кислоты олигомерных сахарных дикислот по изобретению может быть получена со значительно меньшими затратами, что облегчает ее практическое получение, в том числе в промышленных масштабах.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - ЯМР-спектр промежуточного продукта.

Фиг. 2 - масс-спектры дисахаридов, трисахаридов и тетрасахаридов в продукте А.

Фиг. 3 - масс-спектры пентасахаридов, гексасахаридов и гептасахаридов в продукте А.

Фиг. 4 - масс-спектры октасахаридов, нонасахаридов и декасахаридов в продукте А.

Фиг. 5 - ЯМР-спектр продукта А.

Фиг. 6 - ЯМР-спектр продукта В.

Фиг. 7 - ЯМР-спектр продукта С.

Фиг. 8 - ЯМР-спектр продукта D.

Фиг. 9 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуруновой дикислоты на число пересечений места расположения платформы у крыс с болезнью Альцгеймера. Обо-

значения по оси абсцисс на данной фигуре следующие: i - контрольная группа; ii - модельная группа; iii - продукт А; iv - продукт В; v - продукт С; vi - продукт D; vii - гексамер маннуриновой дикислоты.

Фиг. 10 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на расстояние, которое проплывают крысы с болезнью Альцгеймера. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 11 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на продолжительность слезания со стержня у крыс с болезнью Паркинсона на 11-й день. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 12 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на продолжительность латентного периода у крыс с болезнью Паркинсона на 11-й день. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 13а, 13b демонстрирует терапевтический эффект различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на воспалительный энтерит у мышей. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 14 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на уровень глюкозы в крови после приема пищи у мышей с диабетом. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 15 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на латентный период возникновения корчей у мышей, которым вводили уксусную кислоту. Обозначения по оси абсцисс на данной фигуре следующие: i - модельная группа; ii - продукт А; iii - продукт В; iv - продукт С; v - продукт D; vi - гексамер маннуриновой дикислоты.

Фиг. 16 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на количество корчей у мышей, которым вводили уксусную кислоту. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 15.

Фиг. 17 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на количество потираний головы у крыс с мигренью, индуцированной нитроглицерином. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 18 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на количество клеток с экспрессией c-fos в каудальной части спинномозгового ядра тройничного нерва у крыс с мигренью, индуцированной электрической стимуляцией тройничного ганглия. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 19 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на латентный период избегания темноты у мышей с сосудистой деменцией, вызванной двусторонней окклюзией сонных артерий. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 20 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на количество ошибок в тесте избегания темноты у мышей с сосудистой деменцией, вызванной двусторонней окклюзией сонных артерий. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Фиг. 21 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на латентный период спасения в водном лабиринте у мышей с сосудистой деменцией, вызванной двусторонней окклюзией сонных артерий. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

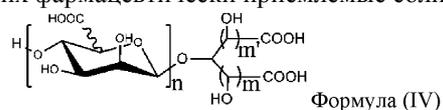
Фиг. 22 демонстрирует влияние различных композиций олигосахаридов и гексамера маннуриновой дикислоты на количество пересечений места расположения платформы у мышей с сосудистой деменцией, вызванной двусторонней окклюзией сонных артерий. Обозначения по оси абсцисс здесь такие же, как на фиг. 9.

Подробное раскрытие изобретения

Далее в настоящем документе подробно описываются различные аспекты данного изобретения, но изобретение не ограничивается этими конкретными воплощениями. Специалисты в данной области техники смогут внести некоторые изменения и дополнения, по существу согласующиеся с приведенным ниже описанием, и эти изменения и дополнения также входят в объем данного изобретения.

Композиция олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты

В первом аспекте данное изобретение относится к композиции получаемых из альгиновой кислоты олигомерных сахарных дикислот, содержащих маннуриновую кислоту, описываемую формулой (IV), и/или гулуриновую кислоту, или их фармацевтически приемлемые соли



где n - целое число, выбираемое из чисел от 1 до 9,

m выбираются из 0, 1 или 2,

m' выбираются из 0 или 1,

и где суммарная масса получаемых из альгиновой кислоты олигомерных сахарных дикислот с n=1-5

составляет не менее чем 60% общей массы композиции, а суммарная масса гулуруновых дикислот составляет не более чем 50% общей массы композиции.

Композиция олигомерных сахарных кислот, получаемых из альгиновой кислоты, по данному изобретению представляет собой смесь маннуруновой и гулуруновой кислот с различными степенями полимеризации; основными компонентами этой композиции являются олигосахариды со степенями полимеризации от 2 до 10, а именно участок М альгиновой кислоты, образованный остатками маннуруновой кислоты, соединенными β -1,4-гликозидными связями; участок G альгиновой кислоты, образованный остатками гулуруновой кислоты, соединенными α -1,4-гликозидными связями; участок MG альгиновой кислоты, образованный гибридизацией указанных двух сахаридов. Согласно предшествующим заявкам известно, что маннуруновые дикислоты обладают фармакологической активностью в отношении болезни Альцгеймера и сахарного диабета, причем наиболее активными в этом отношении сахарами являются пента-, гекса-, гепта-и октасахариды, особенно гексасахариды. В отличие от того, что было известно ранее, авторы изобретения обнаружили, что смесь олигомеров маннуруновой и гулуруновой кислоты со степенями полимеризации от 2 до 10 также обладает фармакологической активностью в отношении болезни Альцгеймера и сахарного диабета, но следует контролировать, чтобы содержание гулуруновых кислот было в определенном диапазоне.

На практике после предварительного расщепления исходной альгиновой кислоты, как описано выше, содержание гулуруновой кислоты в полученном продукте составляет обычно более 30%, самое большее около 70%. Если для получения олигоманнуровой кислоты с высокой активностью следовать тому, что было описано в предшествующих заявках, необходимо в максимально возможной степени удалить гулуруновую кислоту. Однако на основе сделанного авторами изобретения открытия, упомянутого выше, нет необходимости выделять и удалять гулуруновую кислоту из продуктов расщепления альгиновой кислоты. Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что если контролировать содержание гулуруновой кислоты в определенном диапазоне, регулируя условия осаждения под действием кислоты, то возможно достичь такой же или даже более высокой активности композиции по сравнению с гексамером маннуровой кислотой, описанным в предшествующих заявках. Кроме того, поскольку не нужно удалять гулуруновую кислоту как примесь, выход продукта оказывается значительно выше, чем выход продукта, описанного в предшествующих заявках. Таким образом, значительно снижается стоимость процесса получения желаемого продукта, сокращаются отходы, и тем самым облегчается практическое производство, в том числе в промышленных масштабах.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, в которых $n=1-5$, составляет 80-95% общей массы композиции, а суммарная масса гулуруновой кислоты составляет не более чем 50% общей массы композиции.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, отношение суммарной массы олигомерных сахарных дикислот с низкими степенями полимеризации, в которых $n=1-3$, к суммарной массе олигомерных сахарных дикислот с низкими степенями полимеризации, в которых $n=4-7$, составляет от 1,0 до 3,5.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, в которых $m+m'=1$ или 2, составляет не менее 50% общей массы композиции, предпочтительно 60%-90%, более предпочтительно 70%-90%. В частности, в композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, по изобретению суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, в которых $m+m'=1$, составляет не менее 10% общей массы композиции, предпочтительно 30-40%. В другом предпочтительном воплощении в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, в которых $m+m'=2$, составляет не менее 10% общей массы композиции, предпочтительно 30-50%.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, в которых $n=1-5$, составляет 80-95% общей массы композиции.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, в которых $n=1-3$, составляет 20-70% общей массы композиции.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, отношение суммарной массы олигомерных сахарных дикислот, в которых $n=1-3$, к суммарной массе олигомерных сахарных дикислот, в которых $n=4-7$, составляет от 1,0 до 3,5, предпочтительно от 1,0 до 3,0.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, массовое процентное содержание олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, с различными степенями полимеризации со-

ставляет дисахариды 5-25%, трисахариды 15-30%, тетрасахариды 15-28%, пентасахариды 10-25%, гексасахариды 5-15%, гептасахариды 3-10%, октасахариды 2-5%, нонасахариды 1-5%, декасахариды 1-5%. В частности, в композиции по изобретению массовое процентное содержание олигосахаридов следующее: дисахариды 10-20%, трисахариды 18-30%, тетрасахариды 15-28%, пентасахариды 15-20%, гексасахариды 5-10%, гептасахариды 3-5%, октасахариды 2-3%, нонасахариды 1-3%, декасахариды 1-3%.

Согласно одному из предпочтительных воплощений в предлагаемой композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, суммарная масса гулуруновой кислоты, в которой $n=1-3$, составляет 0,1-50% общей массы композиции, предпочтительно 1-30%.

В композиции олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, по изобретению фармацевтически приемлемыми солями олигомерных сахарных дикислот, получаемых из альгиновой кислоты, являются соли натрия или калия.

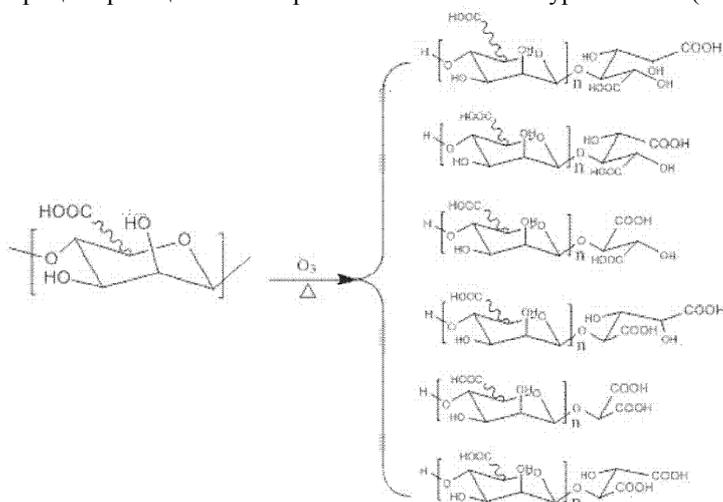
Способ получения композиции олигомерных сахарных дикислот из альгиновой кислоты

Способ получения олигомерных сахарных дикислот из альгиновой кислоты вкратце состоит в следующем.

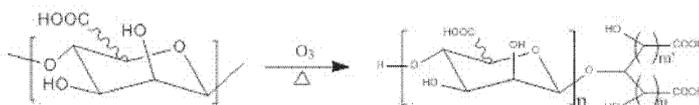
В результате предварительного расщепления альгиновой кислоты получается смесь полисахаридов - полиманнуриновой и полигулуруновой кислот. Эту смесь полисахаридов подвергают осаждению кислотой, чтобы удалить некоторое количество полигулуруновой кислоты. При таком кислотном осаждении чем выше pH, тем выше содержание полигулуруновой кислоты в полученной смеси полисахаридов (см., например, способы, описанные в заявке на патент Китая №№ 98806637.8 и CN02823707.2). В присутствии окислителя цепочки из остатков сахаров в молекулах полисахаридов указанной выше смеси претерпевают окислительное расщепление, так что образуются окисленные олигосахариды с различными степенями полимеризации. В окисленных олигосахаридах остатки маннуриновой и гулуруновой кислот на восстанавливаемом конце олигосахаридной молекулы окислены до сахарных дикислот, содержащих 3-6 атомов углерода.

Согласно изобретению в качестве окислителя для описанной выше реакции окислительного расщепления особенно предпочтителен озон. В этом процессе окислительное расщепление цепочек из остатков Сахаров происходит при введении озона в раствор, содержащий смесь полисахаридов. Окислительное расщепление осуществляется при температуре предпочтительно 0-70°C, более предпочтительно 10-45°C. На этапе окислительного расщепления pH реакционной смеси составляет 3-13, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 6-8.

Использовавшиеся ранее в данной области техники такие процессы, как окислительное расщепление с использованием озона, кислотный гидролиз в присутствии щелочного раствора сульфата меди (см. предшествующий документ) или перекиси водорода и гипохлорита натрия (см. заявку на патент Китая № 01107952.5) сходны в том, что во всех трех способах достигается расщепление цепочек из остатков Сахаров. Разница заключается в том, что различной оказывается структура восстанавливаемого конца полисахаридной цепи продукта расщепления. Согласно изобретению, восстанавливающий конец продукта окислительного расщепления - маннуриновой и гулуруновой кислот - содержит структуру дикарбоновой кислоты, содержащую 3-6 атомов углерода. Кроме того, способ с использованием окислительного расщепления по изобретению обладает и другими преимуществами: 1) условия реакции умеренные, каких-то специальных условий не требуется; 2) озон для окисления можно получать по месту реакции, что снижает сложности, связанные с транспортировкой в промышленном производстве; 3) по окончании реакции окисления озон самопроизвольно превращается в кислород без остаточных реагентов, вредных для окружающей среды. Процесс реакции по изобретению описывается уравнением (VI)



упрощенное изображение первой реакции



(VI)

На приведенном выше изображении реакции (VI) и в общей формуле (IV) олигосахариды, в которых $m=2$ и $m'=1$, являются сахарными кислотами с шестью атомами углерода на конце;

олигосахариды, в которых $m=1$ и $m'=1$ или $m=2$ и $m'=0$, являются сахарными кислотами с пятью атомами углерода на конце;

олигосахариды, в которых $m=1$ и $m'=0$ или $m=0$ и $m'=1$, являются сахарными кислотами с четырьмя атомами углерода на конце;

олигосахариды, в которых $m=0$ и $m'=0$, являются сахарными кислотами с тремя атомами углерода на конце.

В композиции по изобретению суммарная масса полученных из альгиновой кислоты олигомерных сахарных дикислот, в которых $n=1-5$, составляет 80-95% от общей массы композиции; суммарная масса полученных из альгиновой кислоты олигомерных сахарных дикислот, в которых $n=1-3$, составляет 20-70% от общей массы композиции, причем отношение суммарной массы олигомерных сахарных дикислот, в которых $n=1-3$, к суммарной массе олигомерных дикислот, в которых $n=4-7$, составляет от 1,0 до 3,5; предпочтительно от 1,0 до 3,0. Суммарная масса гулурановой кислоты составляет не более чем 50% от общей массы композиции, предпочтительно от 0,1 до 50%, более предпочтительно от 1 до 30%.

В иллюстративном воплощении данного изобретения способ получения включает следующие этапы:

(1) Получение олигомерных сахарных дикислот из альгиновой кислоты: Получение смешанных полисахаридов полиманнурановой и полигулурановой кислот. Как говорилось выше, согласно данному изобретению в качестве исходного сырья используются смешанные полисахариды полиманнурановой и полигулурановой кислот; этот материал можно получить методами, известными в данной области техники, например способами, описанными в заявке на патент Китая №№ 98806637.8 и CN 02823707.2. Обычно используемый способ может быть упрощенно описан следующим образом: альгиновую кислоту предварительно расщепляют, так что образуются смешанные полисахариды - полиманнурановой и полигулурановой кислот. После того, как смешанные полисахариды подвергают осаждению кислотой, содержание полигулурановой кислоты регулируют, получая в результате нужную смесь полисахаридов, содержащих полиманнурановую и полигулурановую кислоты.

Окислительное расщепление озоном

Смешанные полисахариды растворяют в соответствующем количестве воды и перемешивают при комнатной температуре или при нагревании. В реакционную смесь подают непрерывным потоком озон, тем самым начиная реакцию. В реакционной смеси создают pH 3-13, предпочтительно 4-10, более предпочтительно 6-8, добавляя по каплям разбавленную соляную кислоту или разбавленный раствор NaOH. Температуру поддерживают предпочтительно в диапазоне 0-70°C, более предпочтительно 10-45°C. По завершении реакции подачу озона прекращают и доводят pH до нейтрального значения.

Мембранное разделение и очистка

Полученный, как описано выше, продукт переводят в раствор с концентрацией около 10%, этот раствор пропускают через мембрану для ультрафильтрации, чтобы удалить продукты расщепления, более низкомолекулярные, чем моносахариды. Собирают ретентат. Используют мембраны с порогом отсеивания по молекулярной массе 1000-3000 Да, предпочтительно 2000 Да. Собранный материал концентрируют на роторном испарителе и высушивают в вакууме, в результате чего получают смесь олигомерных сахарных дикислот. Анализ получаемых таким образом продуктов показал, что они представляют собой смеси олигосахаридов со степенями полимеризации от 2 до 10, содержание которых варьируется в некоторых пределах соотношений. Этот способ описан в примерах 1-3.

(2) Сравнение олигосахаридных композиций по активности

Сравнивали фармакологическую активность олигосахаридной композиции по данному изобретению с активностью олигомерной (гексамера) маннарановой кислоты по предшествующей заявке. Результаты этого сравнения показывают, что фармакологическая активность олигосахаридной композиции по данному изобретению значительно выше, чем активность гексаманнарановой кислоты по предшествующей заявке. Не связывая себя какой-либо теорией, авторы полагают, что наибольшая фармакологическая активность композиции достигается, когда массовое отношение дисахаридов к гексасахаридам превышает 60%, а суммарная масса гулурановой кислоты составляет не более чем 50% общей массы композиции. Если же количество гулурановой кислоты превышает 60%, то активность снижается.

В данном изобретении также предлагается лекарственное средство или медицинский продукт, содержащие олигосахаридную композицию, полученную из альгиновой кислоты, как она описана выше, и, при необходимости, фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Согласно руководству Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19-е издание (1995), методы получения лекарственных препаратов на основе олигосахаридных композиций с различным содержанием активных ингредиентов известны или очевидны специалистам в данной области техники на основе раскрытия данного изобретения. Способы получения фармацевтических композиций по изобретению предполагают включение в их состав фармацевтических эксципиентов, носителей, разбавителей и др.

Фармацевтические препараты по изобретению получают известными в данной области техники методами, включая методы смешивания, растворения или лиофилизации.

Фармацевтическую композицию по данному изобретению вводят больным различными способами, пригодными для выбранного пути введения, например перорально или парентерально (внутримышечно, внутривенно, местно или подкожно).

Таким образом, композиция по данному изобретению, объединяющая лекарственное вещество с фармацевтически приемлемым носителем (например, инертным разбавителем или съедобным носителем), может быть введена в организм системно, например пероральным путем. Лекарственное вещество и фармацевтически приемлемый носитель могут быть заключены в твердые или мягкие желатиновые капсулы или же спрессованы в таблетки. Для перорального введения в терапевтических целях активное вещество по изобретению объединяют с одним или более эксципиентами и применяют в виде таблеток (проглатываемых, рассасываемых), леденцов, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, цилиндрических таблеток и проч. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 0,1% активного вещества. Впрочем, относительное количество активного вещества в той или иной единичной лекарственной форме таких композиций и препаратов может, конечно же, варьироваться и может составлять от около 1 до около 99 мас.% от данной единичной лекарственной формы. В композициях, используемых в терапевтических целях, количество активного вещества должно быть таким, чтобы достигалась его эффективная доза.

Таблетки, леденцы, пилюли, капсулы и проч. могут также содержать связующие агенты (например, трагакантовую камедь, аравийскую камедь, кукурузный крахмал или желатин); эксципиенты (например, двузамещенный фосфат кальция); дезинтегрирующие агенты (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту и др.); агенты, улучшающие скольжение (например, стеарат магния); подсластители (например, сахарозу, фруктозу, лактозу или аспартам) или ароматизирующие агенты (например, перечную мяту, эфирное масло грушанки или вишневый ароматизатор). Когда единичной лекарственной формой являются капсулы, помимо указанных обычных материалов препарат по изобретению может содержать также жидкий носитель, например растительное масло или полиэтиленгликоль. В единичной лекарственной форме могут также присутствовать различные другие материалы, служащие в качестве оболочки или для иной модификации физической формы препарата. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут иметь оболочку из желатина, воска, шеллака или сахара и подобного. Сиропы и эликсиры могут содержать такие вещества, как сахароза и фруктоза в качестве подсластителей, метилпарабен или пропилпарабен в качестве консервантов, красители и ароматизирующие агенты (например, вишневый или апельсиновый ароматизаторы). Разумеется, любой материал, используемый для изготовления любой единичной лекарственной формы должен быть фармацевтически приемлемым и нетоксичным в тех количествах, в которых он используется в данном конкретном случае. Кроме того, активное вещество по изобретению может быть включено в препарат или систему, обеспечивающие его замедленное высвобождение.

Активное вещество по изобретению можно также вводить внутривенно или внутрибрюшинно путем инфузии или инъекции. Для этого готовят водный раствор активного вещества или его соли, при необходимости вместе с совместимым и водорастворимым нетоксичным поверхностно-активным веществом. Можно также использовать дисперсии в глицерине, жидком полиэтиленгликоле, триацетине и их смесях с маслами. При обычных условиях хранения и использования эти препараты должны включать консерванты для предотвращения размножения микроорганизмов.

Лекарственные формы фармацевтических препаратов по изобретению, пригодные для инъекций или инфузий, включают стерильные водные растворы или дисперсии, или стерильные порошки активных ингредиентов (при необходимости заключенных в липосомы), включая препараты для немедленного использования, пригодные для приготовления растворов или дисперсий, вводимых путем инъекций или инфузий. В любом случае конечная лекарственная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях изготовления и хранения. В качестве жидкого носителя могут использоваться растворители или жидкие дисперсионные среды, в том числе, например, вода, этиловый спирт, многоатомные спирты (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и др.), растительные масла, нетоксичные глицериды, и приемлемые смеси указанных материалов. Должная текучесть препарата обеспечивается, например, формированием липосом, определенным размером частиц (в случае дисперсий) или использованием поверхностно-активных веществ. Для предотвращения размножения микроорганизмов используются различные антибактериальные и фунгицидные агенты (например, парабены, хлорбутиловый спирт, фенол, сорбиновая кислота, тимеросал и др.). Во многих случаях предпочтительно включать в состав композиции по данному изобретению агенты, обеспечивающие нужное осмотическое давление,

например сахара, забуферивающие вещества или хлорид натрия. В случае композиций, вводимых путем инъекции, поглощение ее тканями продлевается с помощью агентов, замедляющих абсорбцию (например, моностеарата алюминия или желатина).

Стерильные растворы для инъекций готовят, объединяя нужное количество активного вещества в подходящем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленные выше, в зависимости от требований, после чего стерилизуют путем фильтрации. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов, вводимых путем инъекций, предпочтительны такие методы, как высушивание в вакууме и лиофилизация, которые позволяют получать активный ингредиент в виде порошка вместе с нужными ингредиентами, присутствовавшими в предварительно профильтрованном стерильном растворе.

В композициях по данному изобретению можно использовать такие твердые носители, как тонкодисперсные твердые вещества, например тальк, глина, микрокристаллическая целлюлоза, кремний, алюминий и проч. В композициях по данному изобретению можно использовать такие жидкие носители, как вода, этиловый спирт или этиленгликоль, или смесь воды, спирта и этиленгликоля; компоненты композиции растворяют или диспергируют в этих носителях в эффективных количествах, при необходимости с помощью нетоксичных поверхностно-активных веществ. Для достижения оптимальных свойств при данном варианте применения препарата в него добавляют вспомогательные ингредиенты (например, ароматизирующие вещества) и дополнительные противомикробные агенты.

Для получения пластичных паст, гелей, мазей, мыла и других продуктов, наносимых непосредственно на кожу, используют также загустители (например, синтетические полимеры, жирные кислоты, соли и эфиры жирных кислот, жирные спирты, модифицированную целлюлозу или модифицированные неорганические материалы).

Количество вещества или включающей его смеси, необходимое для создания терапевтического эффекта, зависит не только от самого этого вещества, но и от способа введения препарата, природы и специфики заболевания, подлежащего лечению, а также от возраста и состояния больного, а в конечном счете - от решения врача или иного медицинского работника.

Указанные выше препараты могут быть представлены единичной лекарственной формой, то есть совокупностью физически отдельных единиц, образующих разовую дозу активного вещества и пригодных для введения человеку и другим млекопитающим. Единичная лекарственная форма может быть представлена капсулой или таблеткой, или набором капсул или таблеток. В зависимости от характера лечения количество активного ингредиента по данному изобретению в разовой дозе препарата варьируется или подбирается от около 0,1 мг до около 1000 мг или больше.

В другом аспекте данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция или медицинский продукт, содержащие композицию олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению и, при необходимости, подходящий носитель.

В другом аспекте данного изобретения предлагается применение композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты для лечения болезни Альцгеймера.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения индивидов, страдающих от болезни Альцгеймера, который включает введение нуждающемуся в этом больному эффективного количества композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению.

В другом аспекте данного изобретения предлагается применение композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты для лечения болезни Паркинсона.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения индивидов, страдающих от болезни Паркинсона, который включает введение нуждающемуся в этом больному эффективного количества композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению.

В другом аспекте данного изобретения предлагается применение композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты для лечения воспаления.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения индивидов с воспалительным процессом, включающий введение нуждающемуся в этом больному эффективного количества композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению.

В другом аспекте данного изобретения предлагается применение композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты для купирования боли.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения индивидов, страдающих от боли, который включает введение нуждающемуся в этом больному эффективного количества композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению.

В другом аспекте данного изобретения предлагается применение композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты для лечения сахарного диабета.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения индивидов, страдающих от сахарного диабета, который включает введение нуждающемуся в этом больному эффективного количества композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению.

В другом аспекте данного изобретения предлагается применение композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты для лечения сосудистой деменции.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается способ лечения индивидов, страдающих от сосудистой деменции, который включает введение нуждающемуся в этом больному эффективного количества композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению.

Боль в контексте данного изобретения включает различные боли, в том числе острую боль; хроническую боль; нейропатическую боль; послеоперационную боль; хроническую боль в нижней части спины; кластерную головную боль; постгерпетическую невралгию; фантомные боли в конечностях; боль, обусловленную поражением центральной нервной системы; зубную боль; боль, не поддающаяся терапии опиоидами; висцеральную боль; боль, связанную с хирургическим вмешательством; боль при повреждении костей: изнеможение и боль при родах; боль, обусловленную ожогами (в том числе солнечными); послеродовые боли; мигрень; стенокардическую боль; боли, связанные с состоянием мочевого тракта (включая боли при цистите); боли, обусловленные сосудистыми нарушениями; невралгию тройничного нерва; межреберную невралгию; боль при хирургических разрезах; боли при хроническом фасциите; боль в области пятки; мышечные боли; костные боли; боли в суставах; боли при раковых заболеваниях; боли при доброкачественных опухолях и др.

Воспаление в контексте данного изобретения включает различные воспалительные процессы, в том числе (не ограничиваясь перечисленным здесь) острое воспаление, хроническое воспаление, васкулярное воспаление, воспаление нервной ткани, воспалительные процессы в центральной нервной системе (например, рассеянный склероз, энцефаломиелит и др.), воспалительные процессы в периферической нервной системе, артриты (например, остеоартрит, сакроилеит, псориатический артрит, ревматоидный артрит и др.), анкилозирующий спондилит, воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона, воспаление толстой кишки при язвенном колите), воспаление при диабетических трофических язвах, системную красную волчанку, воспалительные кожные заболевания (например, псориаз, атопический дерматит, экзема) и др.

Композиции олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению получают способом, отличающимся от ранее известных в данной области техники тем, что не требуется разделять фрагменты М и G альгиновой кислоты. Это значительно упрощает процесс производства и снижает его стоимость. Способ получения олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению характеризуется простотой реакции, высоким содержанием активных ингредиентов в продукте и отсутствием в нем остатков исходных реагентов. Путем испытаний на практике доказано, что композиция олигосахаридов из альгиновой кислоты по данному изобретению может предотвращать и лечить болезнь Альцгеймера, сахарный диабет, болезнь Паркинсона, различные воспалительные процессы, боль и сосудистую деменцию.

Животные модели и этапы определения фармакодинамической активности

1. Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов болезни Альцгеймера.

У крыс вызывали болезнь Альцгеймера путем одностороннего интравентрикулярного введения β -амилоида. Для оценки обучаемости и памяти у подопытных животных использовали водный лабиринт Морриса.

Для этих опытов брали самцов крыс линии Wistar с массой тела 180-220 г. Животных разделяли случайным образом на группы по 14 особей в каждой: контрольная группа с псевдо-операцией (инвазивные мероприятия без биологического воздействия), модельная группа, получающая агент. Сначала животным делали анестезию (внутрибрюшинная инъекция фенобарбитала натрия в дозе 40 мг на 1 кг массы тела), затем фиксировали в стереотаксическом аппарате. Подготавливали и дезинфицировали кожу обычными средствами, делали разрез, обнажая темя, и определяли положение области CA1 гиппокампа как "3 мм кзади от брегмы на расстоянии 2,2 мм от срединного шва черепа и 2,8 мм в глубину от твердой мозговой оболочки" согласно "Rat Brain Stereotactic Atlas" (BAO Xinming, SHU Siyun, Пекин, People's Medical Press, 1991, 28). В каждой из модельной группы и группы, получающей агент, с помощью микроинъектора вводили иглу вертикально к поверхности черепа в область CA1 правого гиппокампа. Животным медленно (1 мкл/мин) вводили по 5 мкл концентрированного препарата β -амилоида (готовили раствор A β 1-40 на солевом растворе, забуференном фосфатом (PBS), концентрацией 1,4 мг/мл и держали его в инкубаторе при температуре 37°C в течение 5 суток, чтобы сформировались агрегаты). По завершении введения иглу не вынимали в течение 5 минут, чтобы амилоид полностью разошелся в ткани; затем иглу медленно извлекали. Разрез зашивали и крыс согревали, чтобы они очнулись. В контрольной группе животным вводили 5 мкл стерилизованного PBS, а все остальное проделывали так же, как описано выше. Терапевтический агент вводили за 7 суток до вмешательства и продолжали вводить до конца эксперимента.

Испытание в водном лабиринте Морриса проводили на 11-й день после вмешательства.

Тест навигации. Крыс всех групп тренировали в течение 5 дней подряд находить скрытую под водой платформу в бассейне. Регистрировали, сколько времени нужно каждой особи, чтобы до нее добраться (период поиска, или латентный период спасения). Если спустя приблизительно 90 с животное не находило платформу, его направляли в воде к ней по прямой траектории и давали там постоять 30 с, что-

бы произошло обучение и запоминание.

Тест пространственного поиска

Через сутки после завершения теста навигации платформу убрали. Теперь каждую крысу пускали в воду в стартовой точке и регистрировали, сколько раз она пересечет место, где была платформа; рассчитывали отношение (в процентах) расстояния, которое животное проплыло в том квадранте, где располагалась платформа, к суммарному расстоянию, преодоленному им во всем бассейне. По этим данным оценивали обучаемость и память у данной особи.

2. Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов болезни Паркинсона.

Эти эксперименты проводили на мышах. Животных разделяли случайным образом на 8 групп по 14 особей в каждой: группа контроля; модельная группа, в которой мыши получали (МРТР), и группа, получающая терапевтический агент. Разделение на группы и введение препаратов проводили в один и тот же день. В контрольной группе и в модельной группе, получающей МРТР, животным вводили интрагастральное физиологический раствор, а в остальных группах мыши получали испытываемый препарат один раз в сутки на протяжении 17 суток подряд. Введение веществ, индуцирующих модель болезни Паркинсона, начинали на 6-й день. В контрольной группе мышам вводили подкожно физиологический раствор в дозе 10 мл на 1 кг массы тела; остальные животные получали МРТР подкожно в дозе 25 мг на 1 кг массы тела один раз в сутки на протяжении 5 суток.

Поведенческие тесты проводили на 11-й, 14-й и 17-й день. Мышь осторожно помещали на стержень (диаметр 8 мм, высота 55 см) головой на его рельефный верхний конец. Регистрировали промежуток времени, требовавшийся животному, чтобы перевернуться из положения головой вверх в положение головой вниз, который является латентным периодом (Тпереворота) и промежуток времени от момента достижения положения "вниз головой" до момента достижения нижнего конца стержня на всех четырех лапах, что является временем спуска вниз (Тслезания). Продолжительность более 30 с регистрировали как 30-секундную. Каждая особь проходила этот тест по 5 раз, и полученные данные усредняли.

МРТР вызывает избирательное повреждение дофаминэргических нейронов в черной субстанции головного мозга. Индуцированное МРТР нейродегенеративное состояние у мышей по патологоанатомическим признакам и клиническим проявлениям является наиболее близкой моделью болезни Паркинсона человека. Основными симптомами болезни Паркинсона являются тремор в состоянии покоя, мышечная ригидность, гипокинезия и др. Тест с переворотом и слезанием со стержня позволяет оценить общую активность и координацию животного.

3. Модель на животных для определения фармакодинамики противовоспалительного эффекта изучаемых препаратов

(1) Модель ревматоидного артрита: артрит, индуцированный коллагеном, у мышей

Для этого эксперимента использовали самцов мышей линии DBA/1 с массой тела 19-22 г. Животных разделяли случайным образом на группы по 8 особей в каждой: группа контроля, модельная группа, и группа, получающая терапевтический агент. Всем мышам, кроме контрольных особей, делали иммунологическую сенсibilизацию, а именно в день 0 вводили путем подкожной инъекции в область основания хвоста бычий коллаген типа II с полным адьювантом Фрейнда (СII-CFA) в дозе 10 мг на 1 кг массы тела, и в день 23 вводили путем внутрибрюшинной инъекции липополисахарид (LPS) в дозе 1,5 мг на 1 кг массы тела. Введение испытываемых препаратов начинали на 28-й день. Мышам контрольной группы и модельной группы давали перорально физиологический раствор, в другой группе давали испытываемый препарат один раз в сутки на протяжении 14 суток подряд. После инъекции липополисахарида животных ежедневно осматривали, наблюдая развитие и течение заболевания. Начиная с того момента, когда у мышей проявлялось заболевание, то есть возникали клинические симптомы артрита, его прогрессирование оценивали по шкале степени тяжести в баллах от 0 до 4 на основании выраженности симптомов (краснота, деформация суставов). Оценка 0 означала отсутствие эритемы и опухание суставов; 1 - эритема и слабое опухание в области предплюсневых костей или заплюсневых суставов или в области костей плюсны и красноту и опухание на одном пальце; 2 - слабые эритема и опухание заплюсневых суставов и области костей плюсны или краснота и опухание более чем двух пальцев; 3 - умеренные эритема и опухание заплюсневых суставов, лучезапястных суставов и области костей плюсны; 4 - сильные покраснение и опухание всех заплюсневых суставов, лучезапястных суставов, области костей плюсны и пальцев. Наибольшее число баллов - 4 для каждой конечности, 16 - для одной особи.

(2) Модель рассеянного склероза, индуцированного MOG, у мышей.

В этом эксперименте использовали самок мышей линии C57BL/6 с массой тела 17-20 г. Для контрольной группы взяли, выбрав случайным образом, пять особей. Остальным животным сделали в день 0 иммуносенсibilизацию путем подкожной инъекции в спинку эмульсии миелин-олигодендроцитарного гликопротеина с полным адьювантом Фрейнда (MOG-CFA) в дозе 10 мг MOG и 20 мг полного адьюванта Фрейнда на 1 кг массы тела, а также в дни 0 и 2 - внутрибрюшинную инъекцию коклюшного токсина в дозе 10 мкг на 1 кг массы тела. Мышам контрольной группы и модельной группы животных давали перорально физиологический раствор, а остальным особям - испытываемый препарат один раз в сутки на протяжении 24 суток подряд. Приблизительно через 12 суток после иммунизации у иммунизированных

мышей развивались симптомы заболевания. С момента появления первых признаков заболевания животных ежедневно тщательно осматривали, отмечали массу тела и давали оценку состояния по шкале клинических симптомов в баллах от 0 до 4, чтобы следить за прогрессированием болезни. Оценка 0 означала нормальный внешний вид без очевидных признаков заболевания; 1 - пониженный тонус хвоста и слабость одной задней конечности; 2 - пониженный тонус хвоста, слабость обеих задних конечностей и шатающаяся походка; 3 - слабость и паралич одной задней конечности; 4 - слабость и паралич обеих задних конечностей.

(3) Модель системной красной волчанки на мышах линии MRL/lpr

У трансгенных мышей линии MRL/lpr, гомозиготных по мутации гена Fas^{lpr}, спонтанно может развиваться гиперплазия лимфоидной ткани. В возрасте около 10-14 недель у таких мышей появляются симптомы системной красной волчанки. Самок трансгенных мышей линии MRL/lpr возрастом 9 недель случайным образом разделяли на группы по 8 особей в каждой: контрольную группу и группу, получающую терапевтический агент. Мышам контрольной группы давали перорально физиологический раствор, остальным - испытываемый препарат один раз в сутки на протяжении 4 недель подряд. Один раз в неделю у всех животных оценивали состояние лимфатических узлов по шкале клинических признаков в баллах от 0 до 6. Оценка 0 означала нормальное состояние; 1 - диаметр узла в одной локализации с обеих сторон менее 1 см; 2 - диаметр узла в двух локализациях с обеих сторон менее 1 см; 3 - диаметр узла в трех локализациях с обеих сторон менее 1 см; 4 - диаметр узла в одной локализации с обеих сторон больше 1 см и в двух других локализациях с обеих сторон меньше 1 см; 5 - диаметр узла в двух локализациях с обеих сторон больше 1 см и в одной другой локализации с обеих сторон меньше 1 см; 6 - диаметр узла в трех локализациях с обеих сторон больше 1 см.

(4) Модель воспалительного заболевания кишечника (IBD) - колит, индуцированный декстрансульфатом натрия (DSS), у мышей

Для этого эксперимента использовали самок мышей линии C57 возрастом 7-8 недель с массой тела 18-20 г, которых случайным образом разделяли на группы по 8 особей в каждой: контрольная группа, модельная группа и группа, получающая терапевтический агент. В модельной группе и группе, получающей терапевтический агент, в дни с 1-го по 7-й мышам давали в составе питьевой воды высокомолекулярный полимер декстрансульфат натрия в концентрации 2,5%. В контрольной группе и в модельной группе мышам вводили перорально физиологический раствор, а остальным животным - испытываемый препарат один раз в сутки на протяжении 30 суток подряд. В день 31 мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков. У каждой особи вскрывали брюшную полость и отделяли брыжейку. Извлекали участок кишечника от начала илеоцекальной области до анального отверстия. Образцы брали последовательно один за другим в каждой группе. Измеряли длину толстой кишки.

4. Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов сахарному диабету

Для этого эксперимента использовали самцов мышей линии NIH. Животных разделяли случайным образом на группы по 10 особей в каждой: контрольную группу; модельную группу, группу, получавшую терапевтический агент. В день начала эксперимента всем мышам, кроме контрольных, вводили путем внутривентриальной инъекции стрептозотоцин в дозе 150 мг на 1 кг массы тела. Испытываемый препарат давали в течение 10 суток подряд. На 11-й день у животных извлекали глазные яблоки и брали кровь для определения концентрации глюкозы.

5. Модель на животных для определения фармакодинамики болеутоляющего эффекта изучаемых препаратов

(1) Модель боли, вызванной уксусной кислотой, у мышей

Мышей линии Kunming (самцов и самок поровну) с массой тела 18-22 г разделяли случайным образом на группы по 10 особей в каждой: контрольная группа, модельная группа и группа, получающих терапевтический агент. Начиная с того дня, когда мышей разделяли на группы, животным контрольной группы вводили интрагастрально дистиллированную воду в количестве 20 мл на 1 кг массы тела один раз в сутки на протяжении 7 суток подряд, остальным животным вводили интрагастрально соответствующий агент также один раз в сутки на протяжении 7 суток подряд. Спустя 1 ч после последнего введения всем животным вводили путем внутривентриальной инъекции 0,2 мл 0,6%-ного раствора уксусной кислоты. Регистрировали латентный период корчей (промежуток времени от момента введения кислоты до возникновения ответной поведенческой реакции (характерных корчей)), а также количество корчей за 20 минут после введения уксусной кислоты.

Введение мышам таких химических веществ, как уксусная кислота, в брюшную полость раздражает брюшину, вызывая стойкую перемежающуюся боль, что проявляется характерными движениями: животное то прижимает брюшко к дну клетки, то втягивает его, прогибает спинку и подтягивает ягодицы, вытягивает задние конечности ("уксусные корчи"). Латентный период корчей (промежуток времени между введением уксусной кислоты и возникновением корчей) и их количество за определенный период времени характеризуют степень болевых ощущений. Чем короче указанный латентный период корчей и чем больше корчей, тем, следовательно, сильнее боль.

(2) Модель мигрени, индуцированной нитроглицерином, у крыс

Самцов крыс линии Sprague Dawley (SD) с массой тела 180-220 г разделяли случайным образом на группы по 8 особей в каждой: контрольная группа, модельная группа и группа особей, получавших терапевтический агент. Введение начинали в день разделения на группы. Животным из контрольной группы и из модельной группы вводили интрагастрально дистиллированную воду один раз в сутки на протяжении 28 суток подряд. Остальным крысам вводили интрагастрально испытываемый препарат один раз в сутки на протяжении 28 суток подряд. Спустя 30 минут после последнего введения всем животным, кроме контрольных особей, вводили нитроглицерин путем подкожной инъекции в правое плечо в дозе 10 мг на 1 кг массы тела. Регистрировали промежуток времени от момента введения нитроглицерина до появления покраснения ушей и продолжительность этой красноты, а также сколько раз в течение 40-45 мин после введения нитроглицерина животное трет голову. Кроме того, определяли содержание серотонина (5-гидрокситриптамина, сокращенно 5-HT) в мозговой ткани методом флуоресцентной спектрофотометрии (длина волны возбуждения флуоресценции 356 нм; длина волны испускания 483 нм). Результаты этих измерений выражали в нанограммах на 1 г массы мозга.

Мигрень - это проявление дисфункции кровеносных сосудов и нервов, обусловленное взаимодействием механизмов этих двух структур. Нитроглицерин вызывает гиперчувствительность нервных волокон тройничного нерва и расширение сосудов мозговых оболочек, инициируя нейрогенное воспаление и активизируя функционирование нейронов гипоталамуса, ствола мозга и спинного мозга; все это проявляется как мигрень. Нитроглицерин-индуцированная мигрень у животных, предложенная в 1995 г., на сегодняшний день является классической моделью этого расстройства. В соответствии с патогенезом нитроглицерин-индуцированной мигрени для оценки ее степени тяжести используют время покраснения ушей, связанного с расширением сосудов; количество потираний головы, связанного с ощущением боли, и содержание серотонина, являющегося фактором чувствительности к боли в мозговой ткани. Чем дольше держится краснота ушей, чем больше животное трет голову и чем выше содержание 5-HT, тем, следовательно, выше степень тяжести мигрени.

(3) Модель мигрени у крыс, индуцированная электрической стимуляцией тройничного ганглия

Самцов крыс линии Sprague Dawley (SD) возрастом 5 месяцев с массой тела 200-240 г разделяли случайным образом на группы по 10 особей в каждой: контрольную группу, группу с псевдо-операцией, модельную группу и группу, получающую терапевтический агент.

Крысы первых трех групп получали перорально дистиллированную воду, особи четвертой группы - испытываемый препарат. После введения, продолжавшегося в течение 10 суток подряд, всем животным, кроме контрольных особей, делали анестезию путем внутрибрюшинной инъекции хлоральгидрата в дозе 350 мг на 1 кг массы тела. Каждую особь фиксировали в стереотаксическом аппарате и делали срединный разрез головы сверху, разрезая кожу и мышцы слой за слоем до обнажения черепа посередине сагиттального шва. При помощи стоматологического бора просверливали отверстие на расстоянии 3 мм кзади и 3 мм в сторону от брегмы и вводили электрод в тройничный ганглий на глубину 9,5 мм от твердой мозговой оболочки. Анестезия продолжалась и после этой операции. Все хирургические манипуляции осуществлялись в стерильных условиях. После стимуляции электроды удаляли. Параметры стимуляции: цикл 200 мс; амплитуда 10 В; ширина импульса 5 мс в течение 10 мин стимуляции. В группе крыс с псевдооперацией животным только вводили электроды, но не делали электростимуляцию. За 7 мин до стимуляции животному вводили в правую бедренную вену краситель голубой Эванса и не позже чем через 20 мин после стимуляции проводили перфузию и фиксацию.

Спустя 5 мин по окончании стимуляции проводили перфузию левого желудочка в течение 2 мин. Делали краниотомию, извлекали цельный мозг и фиксировали для иммуногистохимического определения белка c-fos в патологической зоне. Также определяли локализацию электрода и выделяли участок твердой мозговой оболочки из места введения электрода и из соответственного места другого полушария мозга, промывали деионизованной водой, выкладывали плоским слоем на предметное стекло, подсушивали при температуре 37°C в течение 15 мин и фиксировали 70%-ным глицерином. Измеряли интенсивность флуоресценции указанных участков ткани на стимулированной стороне и на другой (контроль) с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа (длина волны возбуждения флуоресценции 647 нм; длина волны испускания 680 нм). Рассчитывали отношение интенсивностей флуоресценции стимулированная сторона/контроль, отражающее экстравазацию белка плазмы (PPE). Делали непрерывные фронтальные срезы замороженного цельного мозга (толщина среза 10 мкм); клетки с экспрессией c-fos метили для иммунофлуоресцентного анализа. С помощью конфокального микроскопа выбирали случайным образом 5 полей для определения количества клеток с экспрессией c-fos на стимулированной стороне и на другой (контроль) каудальной части ядра спинномозгового пути тройничного нерва и среднее значение по этим пяти полям брали как среднее количество клеток с экспрессией c-fos.

У больных с мигренью в возникновении боли ключевое значение имеет активация нервно-сосудистой системы тройничного нерва; в формировании и сохранении мигренозной боли важную роль играет нейровоспаление мозговых оболочек. Когда ответвления тройничного нерва в твердой мозговой оболочке подвергаются стимуляции, высвобождаются вазоактивные вещества, вызывающие расширение сосудов мозговых оболочек, экстравазацию компонентов плазмы, дегрануляцию тучных клеток и активацию тромбоцитов, в результате чего возникает мигрень. Кроме того, высвобождающиеся после боле-

вой стимуляции нейромедиаторы связываются со своими рецепторами на клеточной мембране. Под действием второго посредника инициируется экспрессия гена *c-fos*, то есть синтезируется соответствующая матричная РНК и транслируется с образованием белка *c-fos*, что ведет к долгосрочным физиологическим эффектам в организме. Таким образом, в процессе мигрени в ядре спинномозгового тракта тройничного нерва и большом ядре шва возрастает количество клеток, в которых образуется матричная РНК и белок *c-fos*.

Следовательно, выраженность мигрени отражается количеством сывороточного белка, вышедшего из твердой мозговой оболочки, и количеством клеток с экспрессией *c-fos* в каудальной части ядра спинномозгового пути тройничного нерва. Чем меньше этих клеток, тем слабее мигрень.

6. Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов сосудистой деменции

(1) Модель сосудистой деменции у мышей с двусторонней окклюзией общих сонных артерий (ВССАо)

Путем двусторонней окклюзии общих сонных артерий у мышей вызывают глобальную ишемию/перфузию головного мозга, что моделирует сосудистую деменцию.

1.1. Разделение животных на группы и введение агентов

В этом эксперименте использовали самцов мышей линии C57BL/6 с массой тела 22 ± 2 г, которых разделяли случайным образом на группы по 10 особей в каждой: группа псевдооперации; группа, в которой животным делали на 30 мин двустороннюю окклюзию общих сонных артерий (сокращенно "30-мин ВССАо"); и группа, получающая терапевтический агент. После разделения на группы мышам группы с псевдо-операцией и группы 30-мин ВССАо вводили интрагастрально дистиллированную воду один раз в сутки в течение 5 суток подряд, после чего мышам группы 30-мин ВССАо делали операцию по двусторонней окклюзии общих сонных артерий. Мышам группы, получающей терапевтический агент, вводили интрагастрально испытываемый препарат один раз в сутки на протяжении 5 суток подряд, после чего делали операцию по двусторонней окклюзии общих сонных артерий. Хирургическое вмешательство в отношении ВССАо заключалось в следующем. Животным делали анестезию фенobarбиталом натрия, делали разрезы по обеим сторонам шеи, выделяли общие сонные артерии и пережимали их на 30 мин, затем снимали пережимавшую сосуд клипсу и зашивали рану. В группе псевдооперации после выделения общих сонных артерий их не пережимали и разрез сразу зашивали. Через 24 ч после операции ВССАо мышам всех групп продолжили давать соответствующие препараты или воду по той же схеме, что и до операции, на протяжении 23 суток подряд. На 7-е сутки после операции проводили тест избегания темноты, на 13-е сутки - тест в водном лабиринте Морриса, чтобы оценить эффект введения композиции с маннурановой дикислотой на обучаемость и память. После проведения поведенческих тестов животных умерщвляли, извлекали и фиксировали ткани головного мозга. Определяли степень повреждения нейронов в гиппокампе после двусторонней окклюзии общих сонных артерий и защитный эффект композиции с маннурановой дикислотой в нейронах такими методами, как окрашивание гематоксилином и эозином.

1.2. Тест избегания темноты

Тест избегания темноты применяется для оценки обучаемости и пространственной памяти у мышей. Нарушение ориентировки в пространстве и пространственной памяти могут появиться только при повреждениях гиппокампа или прилежащих к нему областей мозга. В устройстве для проведения теста избегания темноты используется инстинктивное стремление мышей предпочитать темные места освещенным. Коробку разделяют на две половины, одна из которых освещена, а другая нет, перегородкой, в центре которой имеется небольшое отверстие. В темной половине дно коробки покрыто медной сеткой. Когда мышь оказывается на темной половине, на сетку подают электрический ток, и животное, получив электрический удар, убегает на светлую половину коробки. Мышей тренируют в течение 24 ч, после чего испытание повторяют. Промежуток времени от того момента, когда мышь помещают в освещенную половину коробки, до момента ее перехода в темную половину называют латентным периодом. Чем дольше латентный период и чем реже животное ошибается, тем лучше его способность к запоминанию.

1.3. Тест в водном лабиринте Морриса

В водном лабиринте Морриса животное должно, плавая, обучиться находить расположенную под водой платформу. Этот тест, главным образом, применяется для оценки способности к обучению в отношении запоминания положения в пространстве и направления. Установка для этого теста состоит из цилиндрического бассейна диаметром 80 см и высотой 70 см, в котором имеется подвижная платформа диаметром 8 см. Наверху укреплена цифровая видеокамера, соединенная с компьютером. Перед проведением теста бассейн наполняют чистой водой на глубину 15 см, платформу располагают на 0,5 см под поверхностью воды. В воду добавляют молоко, чтобы она была мутной и платформу не было видно. В течение опыта положение платформы не меняется. В ходе испытания определяли следующие показатели.

Тест навигации применяется для определения способности мыши изучить предложенное пространство и запомнить его. Этот тест проводили в течение 4 суток, начиная с 13-го дня после операции по двусторонней окклюзии общих сонных артерий. Вначале животному устраивали "тренировку": пускали в бассейн по одному разу утром и вечером, всего 8 раз. Тренировка состояла в том, что животное помеща-

ли в бассейн на половине дуги западного квадранта круга и погружали в воду головой к стенке цилиндра. Если мышь не находила платформу в течение 120 с, экспериментатор направлял ее туда и оставлял на платформе на 30 с, чтобы животное запомнило место. С помощью камеры наблюдают и регистрируют путь и время поиска и залезания на платформу для каждой особи и определяют латентный период и скорость плавания. Латентный период спасения в водном лабиринте Морриса - это промежуток времени от момента помещения мыши в воду до момента нахождения ею платформы. Чем короче этот период латентности, тем лучше способность животного к запоминанию.

Тест пространственного поиска используется, чтобы оценить способность мыши сохранять в памяти расположение платформы после того, как она обучилась ее находить. По окончании теста навигации через 1 сутки платформу убирали, мышь помещали в воду в той же исходной точке и регистрировали, сколько раз она пересечет то место, где ранее располагалась платформа. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью автоматической системы регистрации и обработки изображений.

(2) Модель сосудистой деменции у крыс после окклюзии средней мозговой артерии (МСаО)

Путем окклюзии средней мозговой артерии у крыс вызывают фокальную ишемию головного мозга, что моделирует сосудистую деменцию.

2.1. Разделение на группы и введение агентов

В этом эксперименте использовали самцов крыс линии Wistar, которых разделяли на 4 группы по 10 особей в каждой: контрольная группа; группа псевдо-операции, модельная группа (группа МСаО); группа, получавшая терапевтический агент. В контрольной группе, группе псевдо-операции и группе МСаО крысам давали перорально дистиллированную воду; крысам группы с терапевтическим агентом давали олигосахариды из альгиновой кислоты. Через 7 суток введения указанных агентов всем животным, кроме особей из первой контрольной группы, делали анестезию путем внутривенной инъекции хлоральгидрата в дозе 350 мг на 1 кг массы тела и фиксировали на хирургическом столике в положении на левом боку. Под операционным микроскопом рассекали кожу вдоль середины линии, соединяющей край наружного слухового прохода и угол глазной щели, чтобы обнажить скуловую дугу. Соединение с нижней челюстью расширяли небольшим дистрактором. В основании черепа делали отверстие 2×2 мм. Рассекали твердую мозговую оболочку, обнажая среднюю мозговую артерию, и с одной стороны сосуд коагулировали высокочастотным электрокаутером, что вызывало локальную ишемию (в группе псевдо-операции среднюю мозговую артерию обнажали, но не коагулировали). Разрез послойно зашивали. В ходе операции температуру в помещении строго контролировали, поддерживая 24-25°C. После операции продолжали давать животным терапевтический агент либо дистиллированную воду в том же режиме, что и до хирургического вмешательства. На 11-е сутки после операции в каждой группе особей проводили тест в водном лабиринте Морриса.

В водном лабиринте Морриса всех крыс тренировали один раз в сутки на протяжении 5 суток подряд. Для каждой особи регистрировали промежуток времени, который требовался ей для того, чтобы найти платформу (латентный период спасения в тесте навигации). Тех крыс, которые не могли найти платформу за приблизительно 120 с, направляли к платформе по прямой и давали постоять на ней в течение 30 с, чтобы животное выучило и запомнило ее местоположение. По окончании теста навигации через 1 сутки, убрав платформу, крысу помещали в воду в той же исходной точке и регистрировали, через какое время она в первый раз окажется на том месте, где была платформа, и сколько раз она пересечет это место (тест пространственного поиска). Каждому животному давали оценку способности к обучению и запоминанию. Латентный период спасения в водном лабиринте Морриса, то есть промежуток времени от момента помещения животного в воду до того момента, когда оно найдет платформу, тем короче латентный период, тем лучше память у данной особи.

Далее в настоящем документе преимущества данного изобретения иллюстрируются примерами, не имеющими ограничительного характера. Не следует считать конкретные материалы и их количества, а также другие условия опытов, использованные в примерах, ограничивающими данное изобретение. В настоящем документе все значения частей, долей, процентного содержания и т.п. рассчитаны по массе, если только не будет указано иное.

Пример 1.

Этап 1. Получение смеси олигосахаридов из альгиновой кислоты

Готовили раствор альгината натрия (5 кг) в воде концентрацией около 10% и доводили рН до около 3,0, добавляя разбавленную соляную кислоту. Полученный раствор нагревали до 80°C и перемешивали. Оставляли при этой температуре для протекания реакции на 10 ч. По истечении этого времени раствор охлаждали до комнатной температуры и доводили рН до 9,0, добавляя NaOH, после чего прибавляли разбавленную соляную кислоту до рН 3,2. После этого раствор центрифугировали со скоростью 5000 об/мин в течение 10 мин. Собирали супернатант, концентрировали с помощью роторного испарителя и высушивали в вакууме, в результате чего получали 1500 г промежуточного продукта.

На фиг. 1 представлен ЯМР-спектр этого промежуточного продукта. ЯМР-анализ проводили следующим образом. Приготовление образца: отвешивали 30 мг материала, подлежащего анализу, и растворяли в 0,5 мл тяжелой воды (D₂O), затем лиофилизировали; растворяли лиофилизат, прибавляя к нему 0,5

мл тяжелой воды и снова лиофилизировали; наконец, полученный в результате лиофилизации порошок растворяли в нужном количестве тяжелой воды, помещали в пробирку для ЯМР-спектроскопии и получали раствор для анализа концентрацией 100 мг/мл; в качестве внутреннего эталона использовали 0,01%-ный (мас./об.) раствор натриевой соли триметилсилилтетрадегтеропропионовой кислоты (TSP). Сбор данных и обработка: с помощью Фурье-спектрометра 400М регистрировали одномерные протонные спектры при температуре 60°C. Величина импульса 45°, интервал 4 с, время релаксации 1 с, накопление 20-кратное, химический сдвиг от -2 м.д. до 10 м.д. После сбора данных проводилось преобразование Фурье для получения одномерного протонного спектра; сигнал для TSP принимали за 0,00 м.д.

На фиг. 1 видно, что промежуточный продукт содержал участок с маннуровой кислотой (фрагмент М, химический сдвиг 5,1 м.д.) и участок с гулуровой кислотой (фрагмент G, химический сдвиг 5,5 м.д.), а также химерный участок с маннуровой и гулуровой кислотами (фрагмент MG, химический сдвиг 5,3 м.д.). Отвешивали 500 г промежуточного продукта и растворяли в дистиллированной воде, так что получалось 5 л раствора. Доводили pH этого раствора до 6,5 с использованием NaOH и нагревали на водяной бане, поддерживая температуру 75°C. Пропускали через него озон, подобрав скорость газового потока на выходе из цилиндра с кислородом и мощность генератора озона так, чтобы озон поступал в указанный раствор со скоростью 8 г/ч. Через 4 ч протекания реакции подачу озона прекращали и добавляли такое количество воды, чтобы концентрация раствора стала около 10%. Полученный раствор пропускали через мембрану для ультрафильтрации с порогом отсеивания по молекулярной массе 2000 Да и собирали ретентат. Собранную жидкость концентрировали с помощью роторного испарителя и высушивали в вакууме; в результате получали 350 г продукта А.

Этап 2. Анализ соотношения и структур олигосахаридов с различными степенями полимеризации в продукте А, содержащем олигомерные сахарные дикислоты из альгиновой кислоты

Отвешивали точно 100 мг полученного, как описано выше, высушенного продукта А, содержащего олигомерные сахарные дикислоты из альгиновой кислоты, и растворяли в воде в концентрации 10 мг/мл. Пропускали этот раствор через фильтрационную мембрану (0,22 мкм), получая таким образом раствор для анализа. Относительное количество олигосахаридов с различными степенями полимеризации в смеси определяли с использованием эксклюзионной хроматографии на колонках Superdex (GE Healthcare Co.) в сочетании с многоугловым лазерным светорассеянием (MALS, Wyatt Co.). Условия были следующие.

Хроматографическая колонка - Superdex peptide 10/300G1

Подвижная фаза - раствор NaCl 0,1 моль/л

Объем вводимой пробы - 10 мкл

Скорость потока - 0,3 мл/мин

Были получены следующие результаты. Компоненты от дисахаридов до декасахаридов (dp2-dp10) присутствовали в относительном количестве: dp2 - 18%, dp3 - 24%, dp4 - 23%, dp5 - 14%, dp6 - 8%, dp7 - 7%, dp8 - 2%, dp9 - 2% и dp10 - 2%.

Этап 3. Анализ структуры олигосахаридов с различными степенями полимеризации в продукте А, содержащем олигомерные сахарные дикислоты из альгиновой кислоты, методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS)

Условия эксперимента:

Колонка Superdex peptide 10/300G1

Подвижная фаза - 20% метиловый спирт + 80% ацетат аммония (NH₄Ac) (80 ммоль/л)

Скорость потока - 0,1 мл/мин

Температура в колонке - 2°C ± 0,8°C.

Условия масс-спектрометрии:

Тандемный квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр Agilent 6540 QTO;

Источник ионов - электроспрей ESI (напряжение 120 V)

Режим - отрицательные ионы

Диапазон масс m/z - 100-1000.

На фиг. 1-3 представлены масс-спектры олигосахаридов с различными степенями полимеризации. Картина пиков сигналов этих масс-спектров подтверждает молекулярную структуру олигосахаридов в продукте А как структуру, изображенную общей формулой (III). Ниже приведена табл. 1, где представлены структуры и соответствующие им сигналы.

Таблица 1. Структура шести дикислот олигосахаридов с различными степенями полимеризации в продукте А и соответствующие величины отношения масса/заряд

№	Структурная формула	Химическая формула	Отношение масса/заряд (m/z)								
			n=1 [M-1]	n=2 [M-1]	n=3 [M-1]	n=4 [M-1]	n=5 [M-1]	n=6 [M-1]	n=7 [M-2] ²	n=8 [M-2] ²	n=9 [M-2] ²
1		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₆ H ₁₀ O ₈ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₃ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₃ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₄ H ₈ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₄ H ₈ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₃ H ₈ O ₅ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

Из результатов описанного выше масс-спектрометрического анализа следует, что остаток маннуроновой или гулуруновой кислоты на восстанавливаемом конце полисахаридной цепи в продукте А окисляется до структуры сахарной кислоты (см. общую формулу IV); эта структура может быть структурой маннуровой или гулуруновой кислоты, включающей шесть атомов углерода (m+m'=3), которая содержится в количестве примерно 10%-30%, или продукта декарбокислирования маннуровой или гулуруновой кислоты, то есть сахарной дикислоты, содержащей пять атомов углерода (m+m'=2), которая присутствует в количестве (30-50%) и сахарной дикислоты с четырьмя атомами углерода (m+m'=1), содержание которой 30%-40%.

Этап 4. Анализ методом ЯМР содержания гулуруновой кислоты в продукте А, содержащем олигомерные сахарные дикислоты из альгиновой кислоты

Приготовление образца: отвешивали 50 мг материала, подлежащего анализу, и растворяли в 0,5 мл тяжелой воды (D₂O), затем лиофилизовали; для растворения лиофилизата к нему прибавляли 0,5 мл тяжелой воды и снова лиофилизовали; наконец, полученный в результате лиофилизации порошок растворяли в нужном количестве тяжелой воды, помещали в пробирку для ЯМР-спектроскопии и получали раствор для анализа концентрацией 100 мг/мл; в качестве внутреннего эталона использовали 0,01%-ный (масса/объем) раствор натриевой соли триметилсилилтетрадегтеропропионовой кислоты (TSP).

Сбор данных и обработка: с помощью Фурье-спектрометра 400М регистрировали одномерные протонные спектры при комнатной температуре (величина импульса 45°, интервал 4 с, время релаксации 1 с, накопление 20-кратное, химический сдвиг от -2 м.д. до 10 м.д.). После сбора данных проводилось преобразование Фурье для получения одномерного протонного спектра; сигнал для TSP принимали за 0,00 м.д. На фиг. 5 представлен спектр 1H-ЯМР продукта А. На фиг. 5 мультиплет с химическим сдвигом 4,6 м.д. - сигнал протона в положении С-1 маннуроновой кислоты (М); мультиплет с химическим сдвигом 5,0 м.д. - сигнал протона в положении С-1 гулуруновой кислоты (G); мультиплет с химическим сдвигом 4,9 м.д. - сигнал протона в положении С-1 участка, включающего маннуроновую и гулуруновую кислоту (MG). Содержание гулуруновой кислоты рассчитывали по формуле

$$G\% = \frac{I_{5,0} + 0,5I_{4,9}}{I_{5,0} + I_{4,6} + I_{4,9}} \times 100\%$$

В этой формуле I_{4,6}, I_{5,0} and I_{4,9} - величины интегральной интенсивности сигнала протона в положении С-1 маннуроновой кислоты (М), гулуруновой кислоты (G) и химерного участка, включающего маннуроновую и гулуруновую кислоту (MG) соответственно. По расчетам содержание гулуруновой кислоты в продукте А составляет 30%.

Пример 2.

Отвешивали 100 г имеющегося в продаже альгината натрия (приобретен на сайте Sinopharm Reagent Co., CAS № 9005-38-3, химически чистый, контроль качества химических реагентов в Шанхае) добавляли дистиллированную воду, перемешивали до гомогенного состояния и после набухания довели объем раствора до 1 л. Доводили pH полученного раствора до 4,0 при помощи NaOH. Реакцию проводили при комнатной температуре (25°C). Пропускали через раствор озон, подобрав скорость газового потока на выходе из цилиндра с кислородом и мощность генератора озона так, чтобы озон поступал в указанный раствор со скоростью 1 г/ч. Через 10 ч протекания реакции подачу озона прекращали и добавляли такое количество воды, чтобы концентрация раствора стала около 15%. Полученный раствор пропускали через мембрану для ультрафильтрации с порогом отсеивания по молекулярной массе 1000 Да и собирали ретенат. Собранную жидкость концентрировали с помощью роторного испарителя и высушивали в вакууме; в результате получали 80 г продукта В.

Относительное количество олигосахаридов с различными степенями полимеризации в продукте В

определяли методом эксклюзионной хроматографии на колонках Superdex (GE Healthcare Co.) в сочетании с многоугловым лазерным светорассеянием (MALS, Wyatt Co.). Измерения проводили так же, как описано в соответствующем разделе примера 1. Были получены следующие результаты. Компоненты от дисахаридов до декасахаридов (dp2-dp10) присутствовали в относительном количестве: dp2 - 25%, dp3 - 24%, dp4 - 18%, dp5 - 13%, dp6 - 10%, dp7 - 5%, dp8 - 2%, dp9 - 2% и dp10 - 1%.

Содержание гулуруновой кислоты в продукте В составляло 50% по данным анализа методом ЯМР с помощью Фурье-спектрометра 400М при температуре 60°C. Измерения проводили так же, как описано в соответствующем разделе примера 1. На фиг. 6 представлены протонные ЯМР-спектры; видно, что интегральные интенсивности сигнала (площадь под пиком) для маннуруновой кислоты (М, химический сдвиг 4,6 м.д.) и для гулуруновой кислоты (G, химический сдвиг 5,0 м.д.) относительно близки, в то время как интегральная интенсивность сигнала для химерного участка, включающего и маннуруновую, и гулуруновую кислоты (MG, химический сдвиг 4.9 м.д.), невелика. По приведенной выше формуле расчета содержания гулуруновой кислоты (G) оно составляет 50%.

Пример 3.

Отвешивали 100 г промежуточного продукта по примеру 1. Прибавляли воду, доводили pH полученной суспензии до щелочного, добавляя NaOH, чтобы порошок полностью растворился. Доливали воды до объема 1 л и доводили pH до 2,95, добавляя HCl. Появлялся белый осадок, который удаляли путем центрифугирования. Собирали супернатант. Разводили его дистиллированной водой до объема 1,5 л. В полученном растворе доводили pH до 9,0, добавляя NaOH. Реакцию проводили на водяной бане при температуре 45°C. Пропускали через раствор озон, подобрав скорость газового потока на выходе из цилиндра с кислородом и мощность генератора озона так, чтобы озон поступал в указанный раствор со скоростью 3 г/ч. Через 2 ч протекания реакции подачу озона прекращали и добавляли такое количество воды, чтобы концентрация раствора стала около 5%. Полученный раствор пропускали через мембрану для ультрафильтрации с порогом отсечения по молекулярной массе 3000 Да и собирали ретентат. Собранную жидкость концентрировали с помощью роторного испарителя и высушивали в вакууме; в результате получали 60 г продукта С.

Относительное количество олигосахаридов с различными степенями полимеризации в продукте С определяли путем эксклюзионной хроматографии на колонках Superdex (GE Healthcare Co.) в сочетании с многоугловым лазерным светорассеянием (MALS, Wyatt Co.). Измерения проводили так же, как описано в соответствующем разделе примера 1. Были получены следующие результаты. Компоненты от дисахаридов до декасахаридов (dp2-dp10) присутствовали в относительном количестве: dp2 - 9%, dp3 - 21%, dp4 - 27%, dp5 - 18%, dp6 - 13%, dp7 - 6%, dp8 - 3%, dp9 - 2% и dp10 - 1%.

Содержание гулуруновой кислоты в продукте С составило 10% по данным анализа методом ЯМР с помощью Фурье-спектрометра 400М при температуре 60°C. Измерения проводили так же, как описано в соответствующем разделе примера 1. Полученные результаты представлены на фиг. 7; видно, что интегральная интенсивность сигнала для маннуруновой кислоты (М, химический сдвиг 4,6 м.д.) в 13 превышает интегральную интенсивность сигнала для гулуруновой кислоты (G, химический сдвиг 5,0 м.д.), а интегральная интенсивность сигнала для химерного участка, включающего и маннуруновую, и гулуруновую кислоты (MG, химический сдвиг 4,9 м.д.), близка к значению для гулуруновой кислоты. По приведенной выше формуле расчета содержания гулуруновой кислоты (G) оно составляет 10%.

Пример 4. Оценка фармакологической активности композиции олигомерных сахарных дикислот из альгиновой кислоты в сравнении с гексамером маннуруновой кислоты

Приготовление образцов

1. Получение гексамера маннуруновой кислоты

Было получено 20 г гексамера маннуруновой кислоты способами, описанными в примерах 1 и 2 предшествующего патента 200580009396.5.

В табл. 2, приведенной ниже, представлено содержание различных олигосахаридов и гулуруновой кислоты в продуктах А, В и С, полученных в описанных выше примерах 1, 2 и 3 настоящего документа.

2. Получение продукта D

Получали продукт с высоким содержанием гулуруновой кислоты способом, описанным в примере 2 выше. Исходным материалом взяли альгинат натрия с высоким содержанием гулуруновой кислоты, предоставленный компанией Qingdao Haizhilin Biotechnology Development Co., Ltd. Способ получения был такой же, как описано в соответствующей части примера 2. А именно 500 г порошка альгината натрия с высоким содержанием гулуруновой кислоты смешивали с дистиллированной водой до гомогенного состояния; после набухания доливали воды до объема 5 л и доводили pH, добавляя NaOH. Реакцию проводили при комнатной температуре (25°C). Пропускали через раствор озон, подобрав скорость газового потока на выходе из цилиндра с кислородом и мощность генератора озона так, чтобы озон поступал в указанный раствор со скоростью 1 г/ч. Через 12 ч протекания реакции подачу озона прекращали и добавляли такое количество воды, чтобы концентрация раствора стала около 15%. Полученный раствор пропускали через мембрану для ультрафильтрации с порогом отсечения по молекулярной массе 1000 Да и собирали ретентат. Собранную жидкость концентрировали с помощью роторного испарителя и высуши-

вали в вакууме; в результате получали 350 г продукта D.

Относительное количество олигосахаридов с различными степенями полимеризации в продукте D определяли путем эксклюзионной хроматографии на колонках Superdex (GE Healthcare Co.) в сочетании с многоугловым лазерным светорассеянием (MALS, Wyatt Co.). Измерения проводили так же, как описано в соответствующем разделе примера 1. Были получены следующие результаты. Компоненты от дисахаридов до декасахаридов (dp2-dp10) присутствовали в относительном количестве: dp2 - 18%, dp3 - 26%, dp4 - 20%, dp5 - 15%, dp6 - 8%, dp7 - 7%, dp8 - 3%, dp9 - 2% и dp10 - 1%.

Содержание гулуруновой кислоты в продукте B составило 60% по данным анализа методом ЯМР с помощью Фурье-спектрометра 400М при температуре 60°C. Измерения проводили так же, как описано в соответствующем разделе примера 1. Протонные спектры ЯМР представлены на фиг. 8; видно, что интегральная интенсивность сигнала для гулуруновой кислоты (G, химический сдвиг 5,0 м.д.) превышает интегральную интенсивность сигнала для маннуруновой кислоты (M, химический сдвиг 4,6 м.д.), а интегральная интенсивность сигнала для химерного участка, включающего и маннуруновую и гулуруновую кислоты (MG, химический сдвиг 4,9 м.д.) меньше. По приведенной выше формуле расчета содержания гулуруновой кислоты (G) оно составляет 60%.

Таблица 2. Содержание различных олигосахаридов и гулуруновой кислоты в композициях олигомерных дикислот из альгиновой кислоты

Содержание Продукт	Дисахариды	Трисахариды	Тетрасахариды	Пентасахариды	Гексасахариды	Гептасахариды	Октасахариды	Нонасахариды	Декасахариды	Гулуруновая кислота
A	18%	24%	23%	14%	8%	7%	2%	2%	2%	30%
B	25%	24%	18%	13%	10%	5%	2%	2%	1%	50%
C	9%	21%	27%	18%	13%	6%	3%	2%	1%	10%
D	18%	26%	20%	15%	8%	7%	3%	2%	1%	60%

Для исследования фармакодинамики брали образцы массой по 10 г каждого из продуктов A, B, C, D и гексамера маннуруновой дикислоты. Сравнивали фармакологическую активность четырех композиций олигомерных сахарных дикислот из альгиновой кислоты по данному изобретению с активностью гексамера маннуруновой дикислоты способами, описанными в разделах "Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов болезни Альцгеймера", "Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов болезни Паркинсона", "Модель на животных для определения фармакодинамики противовоспалительного эффекта изучаемых препаратов", "Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов сахарному диабету", "Модель на животных для определения фармакодинамики болеутоляющего эффекта изучаемых препаратов", "Модель на животных для определения фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов сосудистой деменции" в настоящем документе.

1. Определение фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов болезни Альцгеймера

В этих экспериментах в модельной группе латентный период обнаружения платформы был значительно дольше, чем в группе с псевдооперацией, что свидетельствовало об успешности использованной модели заболевания. По сравнению с модельной группой латентный период обнаружения платформы у всех особей, получавших терапевтический агент, был значительно короче.

Через сутки после завершения теста навигации платформу убрали и проводили тест пространственного поиска. Регистрировали, сколько раз животное пересечет место, где была платформа; рассчитывали отношение (в процентах) расстояния, которое животное проплыло в том квадранте, где располагалась платформа, к суммарному расстоянию, преодоленному им во всем бассейне. По этим данным оценивали обучаемость и память у данной особи. Результаты этих опытов показали, что по сравнению с группой с псевдооперацией в модельной группе количество пересечений места расположения платформы было значительно меньше, а в группе, получавшей терапевтический агент этой псевдооперацией, показатель был значительно выше (см. фиг. 9). Отношение (в процентах) расстояния, которое животное проплыло в том квадранте, где располагалась платформа, к суммарному расстоянию, преодоленному им во всем бассейне, в указанных группах различалось так же, как и количество пересечений места расположения платформы. По сравнению с группой с псевдооперацией в модельной группе отношение (в процентах) расстояния, которое животное проплыло в том квадранте, где располагалась платформа, к суммарному расстоянию, преодоленному им во всем бассейне, было значительно меньше, а в группе, получавшей лекарственный агент, этот показатель был значительно выше (см. фиг. 10).

Результаты этих опытов показали, что фармакодинамическая активность продуктов A, B и C выше, чем гексамера маннуруновой дикислоты, следовательно, композиция олигосахаридов с определенным содержанием гулуруновой кислоты, в которой отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов превышает 60%, обладает синергическим действием. А композиция олигосахаридов D, в которой содержание гулуруновой кислоты было более высоким, имеет более низкую активность.

2. Определение фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов болезни Паркинсона

В этом эксперименте латентный период и продолжительность слезания со стержня у животных в

модельной группе были значительно продолжительнее, чем у особей контрольной группы. А в группе, получавшей терапевтический агент, эти показатели были в той или иной степени меньше, чем у особей из модельной группы, причем фармакодинамическая активность продуктов А, В и С была выше, чем у гексамера маннуронової дикислоты с единственной степенью полимеризации, который ранее считался наиболее активным. Не связывая себя какой-либо теорией, авторы полагают, что содержание гулурунової кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта, и, если содержание гулурунової кислоты слишком велико, активность композиции снижается (см. фиг. 11 и 12).

3. Определение фармакодинамики противовоспалительного эффекта изучаемых препаратов

(1) Модель артрита, индуцированного коллагеном, у мышей

В этом эксперименте у модельной группы были отчетливые симптомы артрита по сравнению с контрольной группой: умеренные эритема и опухание заплюсневых суставов, лучезапястных суставов и области костей плюсны. Оценка клинического состояния достигала 6 баллов, что свидетельствовало об успешности использованной модели. У животных, получавших терапевтический агент, выраженность симптомов артрита была в той или иной степени меньше, чем у особей из модельной группы. Введение продуктов А, В и С значительно задерживало начало заболевания по сравнению с гексамером маннуронової дикислоты - олигосахаридом с единственной степенью полимеризации. Оценка клинической картины в баллах также была меньше в случае продуктов А, В и С по сравнению с гексамером маннуронової дикислоты. Следовательно, фармакодинамическая активность продуктов А, В и С выше, чем у гексамера маннуронової дикислоты. Что касается продукта D, то в этом случае заболевание начиналось раньше и оценка клинической картины была больше, чем в случае гексамера маннуронової дикислоты, а значит, активность продукта D была слабее. Это говорит о том, что содержание гулурунової кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта, и, если содержание гулурунової кислоты слишком велико, активность композиции снижается.

(2) Модель рассеянного склероза, индуцированного MOG, у мышей

В данном тесте у большинства мышей в модельной группе наблюдалась слабость и паралич обеих задних конечностей (в отличие от контрольной здоровой группы). Средняя оценка клинической картины в этой группе достигала 3 баллов, что свидетельствовало об успешности использованной модели заболевания. У мышей, получавших терапевтический агент, прогрессирование воспаления было в той или иной степени слабее, чем у модельной группы. Оценка клинической картины у особей, получавших продукты А, В и С, на протяжении всего эксперимента и в конечной точке были ниже, чем у тех животных, которые получали гексамер маннуронової дикислоты; это свидетельствовало о том, что фармакодинамическая активность продуктов А, В и С выше, чем у гексамера маннуронової дикислоты. Что касается продукта D, то оценка клинической картины у получавших его особей на протяжении всего эксперимента и в конечной точке были несколько выше; это свидетельствовало о том, что его активность самая слабая. Это говорит о том, что содержание гулурунової кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта, и, если содержание гулурунової кислоты слишком велико, активность композиции снижается.

(3) Модель системной красной волчанки на мышцах линии MRL/lpr

У трансгенных мышей линии MRL/lpr, начиная с 10-й недели жизни, спонтанно развивалось заболевание, проявлявшееся, в частности, опуханием лимфатических узлов, причем оценка состояния лимфатических узлов в баллах возрастала со временем, что свидетельствовало об успешности использованной модели заболевания и быстром прогрессировании этого заболевания. В группе мышей, получавших терапевтический агент, прогрессирование заболевания в той или иной степени ослабевало по сравнению с модельной группой. Продукты А, В и С по сравнению с гексамером маннуронової дикислоты значительно задерживали начало заболевания у мышей, и оценка состояния лимфатических узлов в случае этих трех продуктов также была меньше, что свидетельствовало об их более высокой фармакодинамической активности. Что касается продукта D, то в этом случае заболевание начиналось раньше, и оценка состояния лимфатических узлов была выше, чем в случае гексамера маннуронової дикислоты, что говорит о более слабой активности этого продукта. Следовательно, содержание гулурунової кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта, и, если содержание гулурунової кислоты слишком велико, активность композиции снижается.

(4) Модель колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS), у мышей

После завершения этого теста в модельной группе животных длина толстой кишки была существенно меньше, чем у здоровых особей контрольной группы, вследствие воспаления, вызванного декстрансульфатом натрия, и большинство таких мышей теряли в массе тела. Из числа животных в модельной группе почти половина позже умерла, что свидетельствовало об очень тяжелом воспалении кишечника. У особей, получавших терапевтический агент, по сравнению с модельной группой воспаление кишечника было в той или иной степени слабее, что проявлялось в меньшем укорочении толстой кишки и более высокой выживаемости. На фиг. 13a и 13b видно, что в случае продуктов А, В и С длина толстой кишки

и выживание мышей были выше, чем в случае гексамера маннурановой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакодинамической активности всех продуктов А, В и С по сравнению с гексамером маннурановой дикислоты. Что касается продукта D, то в этом случае длина толстой кишки и выживание мышей были несколько меньше, чем в случае гексамера маннурановой дикислоты, что свидетельствовало о более слабой активности этого продукта. Результаты данного эксперимента согласуются с описанными выше, указывая на то, что содержание гулурановой кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта, и, если содержание гулурановой кислоты слишком велико, активность композиции снижается.

4. Определение фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов сахарному диабету

В этом тесте сравнивали модельную группу с контрольной здоровой группой, и в модельной группе животных уровень глюкозы в крови после приема пищи был значительно выше, что свидетельствовало об успешности использованной модели заболевания. В группе животных, получавших терапевтический агент, уровень глюкозы в крови был значительно ниже, чем в модельной группе. При этом фармакодинамическая активность каждого из продуктов А, В и С была выше, а продукта D - ниже, чем у гексамера маннурановой дикислоты. Результаты данного эксперимента согласуются с описанными выше, указывая на то, что содержание гулурановой кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта. Однако, если содержание гулурановой кислоты слишком велико, активность композиции снижается (см. фиг. 14).

5. Определение фармакодинамической активности изучаемых препаратов, противодействующей боли

(1) Модель боли, индуцированной укусовой кислотой, у мышей

В этом эксперименте латентный период возникновения корчей у мышей модельной группы был значительно короче и количество корчей за определенный промежуток времени больше, чем у животных контрольной группы, что свидетельствовало об успешности использованной модели. У мышей, которым вводили терапевтический агент, латентный период возникновения корчей был гораздо продолжительнее и количество корчей значительно меньше, чем у животных модельной группы. В случае каждого из продуктов А, В и С латентный период возникновения корчей был продолжительнее и их количество было меньше, чем в случае использования гексамера маннурановой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакодинамической активности каждого из этих продуктов по сравнению с гексамером маннурановой кислоты. В случае продукта D латентный период возникновения корчей был короче и их количество несколько больше, чем в случае гексамера маннурановой кислоты, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D. Результаты данного эксперимента согласуются с описанными выше, указывая на то, что содержание гулурановой кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта. Однако, если содержание гулурановой кислоты слишком велико, активность композиции снижается (см. фиг. 15 и 16.).

(2) Модель мигрени, индуцированной нитроглицерином, у крыс

У крыс после подкожной инъекции нитроглицерина приблизительно через 3 мин появляется краснота ушей, которая держится около 2,5 ч. У животных модельной группы количество потираний головы за 30-45 мин после возникновения указанного симптома было значительно больше, чем у здоровых животных контрольной группы. У животных, получавших терапевтический агент, краснота ушей появлялась значительно позже и продолжалась меньше, и количество потираний головы за 30-45 мин было меньше, чем у особой модельной группы. В случае продуктов А, В и С количество потираний головы было меньше, чем в случае гексамера маннурановой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакологической активности каждого из продуктов А, В, и С по сравнению с гексамером маннурановой дикислоты. В случае продукта D количество потираний головы у крыс было несколько больше, чем в случае гексамера маннурановой кислоты, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D. Результаты данного эксперимента согласуются с описанными выше, указывая на то, что содержание гулурановой кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта. Однако, если содержание гулурановой кислоты слишком велико, активность композиции снижается (см. фиг. 17.).

(3) Модель мигрени, индуцированная электрической стимуляцией тройничного ганглия, у крыс

Электрическая стимуляция тройничного ганглия вызывает у крыс экстравазацию белка плазмы крови в сосудах твердой мозговой оболочки. У животных модельной группы экстравазация белка плазмы крови была значительно более выражена и количество клеток с экспрессией c-fos было гораздо больше, чем у здоровых животных контрольной группы и у животных из группы псевдо-операции. У животных, получавших терапевтический агент, экстравазация белка плазмы крови была значительно менее выражена и количество клеток с экспрессией c-fos было гораздо меньше, чем у животных модельной группы. В случае продуктов А, В и С количество клеток с экспрессией c-fos было меньше, чем в случае гексамера маннурановой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакологической активности каждого из продуктов А, В, и С по сравнению с гексамером маннурановой дикислоты. В случае группы продукта D количество клеток с экспрессией c-fos было несколько больше, чем в случае гексамера маннурановой кислоты, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D. Результаты данного экс-

перимента согласуются с описанными выше, указывая на то, что содержание гулуруновой кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта. Однако, если содержание гулуруновой кислоты слишком велико, активность композиции снижается (см. фиг. 18.).

6. Определение фармакодинамики противодействия изучаемых препаратов сосудистой деменции

(1) Модель сосудистой деменции, вызванной двусторонней окклюзией общих сонных артерий, у мышей (ВССАО)

1.1. Результаты теста избегания темноты

В ходе эксперимента сравнивали модельную группу мышей и группу мышей с псевдо-операцией. В модельной группе латентный период избегания темноты был значительно короче и количество ошибок больше, что свидетельствовало о том, что у животных с двусторонней окклюзией общих сонных артерий способность к запоминанию существенно снижена а, значит, сосудистая деменция была смоделирована успешно. В группе животных, получавших терапевтический агент, латентный период избегания темноты был значительно продолжительнее и количество ошибок гораздо меньше, чем у мышей модельной группы. В случае продуктов А, В и С латентный период избегания темноты был дольше, чем в случае гексамера маннуруновой дикислоты, а также количество ошибок для продуктов А, В и С было меньше, чем для гексамера маннуруновой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакологической активности продуктов А, В, и С по сравнению с гексамером маннуруновой дикислоты. В случае продукта D латентный период избегания темноты был несколько короче, чем в случае гексамера маннуруновой кислоты, и количество ошибок также было немного выше, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D. Результаты данного эксперимента согласуются с описанными выше, указывая на то, что содержание гулуруновой кислоты в композиции и отношение количества дисахаридов к количеству гексасахаридов существенно влияют на активность продукта. Однако, если содержание гулуруновой кислоты слишком велико, активность композиции снижалась (см. фиг. 19 и 20.).

1.2 Результаты теста в водном лабиринте Морриса

В ходе эксперимента в модельной группе латентный период спасения в водном лабиринте Морриса был значительно продолжительнее, чем в группе псевдооперации, что свидетельствовало о том, что модель вызванной ВССАО сосудистой деменции успешно функционирует. В группе животных, получавших терапевтический агент, латентный период спасения был значительно короче, чем у мышей модельной группы. В случае продуктов А, В и С латентный период спасения был короче, чем в случае гексамера маннуруновой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакологической активности продуктов А, В, и С по сравнению с гексамером маннуруновой дикислоты. В случае продукта D латентный период спасения был несколько длиннее, чем в случае гексамера маннуруновой кислоты, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D. (См. фиг. 21.)

Через 4 суток после проведения теста навигации платформу убирали и проводили тест пространственного поиска, определяя, сколько раз животное пересекает место, где была платформа. В сравнении с группой псевдооперации количество пересечений места прежнего расположения платформы мышами модельной группы было значительно меньше, что свидетельствовало о том, что двусторонняя окклюзия общих сонных артерий приводит к значительному снижению способности к запоминанию, в то время как в группе животных, получавших терапевтический агент, количество пересечений места прежнего расположения платформы было больше. В случае продуктов А, В и С количество пересечений места прежнего расположения платформы был больше, чем в случае гексамера маннуруновой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакологической активности продуктов А, В, и С по сравнению с гексамером маннуруновой дикислоты. В случае продукта D количество пересечений места прежнего расположения платформы был несколько меньше, чем в случае гексамера маннуруновой кислоты, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D. (См. фиг. 22.)

(2) Эффект испытываемых препаратов у крыс с сосудистой деменцией, вызванной окклюзией средней мозговой артерии (МСаО)

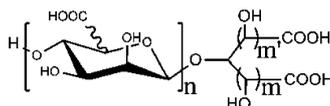
В ходе эксперимента в модельной группе латентный период спасения в водном лабиринте Морриса был значительно продолжительнее, чем в группе псевдооперации, что свидетельствовало о том, что модель вызванной МСаО сосудистой деменции успешно функционировала. В группе животных, получавших терапевтический агент, латентный период спасения был значительно короче, чем у мышей модельной группы. В случае продуктов А, В и С латентный период спасения был короче, чем в случае гексамера маннуруновой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакологической активности продуктов А, В, и С по сравнению с гексамером маннуруновой дикислоты. В случае продукта D латентный период спасения был несколько длиннее, чем в случае гексамера маннуруновой кислоты, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D.

Через 1 сутки после проведения теста навигации платформу убирали и проводили тест пространственного поиска, определяя, сколько раз животное пересекает место, где была платформа, за 2 мин. Количество пересечений места прежнего расположения платформы в модельной группе было значительно меньше, чем в группе псевдооперации, что свидетельствовало о том, что окклюзия средней мозговой артерии приводит к значительному снижению способности к запоминанию, что время как в группе жи-

вотных, получавших терапевтический агент, количество пересечений места прежнего расположения платформы было выше. В случае продуктов А, В и С количество пересечений места прежнего расположения платформы было выше, чем в случае гексамера маннуриновой дикислоты, что свидетельствовало о более высокой фармакологической активности продуктов А, В, и С по сравнению с гексамером маннуриновой дикислоты. В случае продукта D количество пересечений места прежнего расположения платформы было несколько меньше, чем в случае гексамера маннуриновой кислоты, что свидетельствовало о более слабой активности продукта D.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, где композиция содержит смесь маннуриновой кислоты и гулуриновой кислоты формулы (IV), или их фармацевтически приемлемые соли:



Формула (IV)

где n - целое число, выбранное из чисел от 1 до 9,

m выбрано из 0, 1 или 2,

m' выбрано из 0 или 1 и

суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, в которых $n=1-5$, составляет не менее чем 60% от общей массы композиции;

причем суммарная масса гулуриновой кислоты составляет 0,1-50% от общей массы композиции, и в которой суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $m+m'=1$ или 2 составляет не менее 50% от общей массы композиции.

2. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.1, в которой суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $m+m'=1$ или 2 составляет 60-90%, более предпочтительно 70-90%.

3. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.2, в которой суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $m+m'=1$, составляет не менее 10% от общей массы композиции, предпочтительно 30-40%.

4. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.1, в которой суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $m+m'=2$ составляет не менее 10% от общей массы композиции, предпочтительно 30-50%.

5. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.1, в которой суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $n=1-5$ составляет 80-95% от общей массы композиции.

6. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.1, в которой суммарная масса олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $n=1-3$ составляет 20-70% от общей массы композиции.

7. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.1, в которой отношение суммарной массы олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $n=1-3$ к суммарной массе олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $n=4-7$ составляет от 1,0 до 3,5.

8. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.7, в которой отношение суммарной массы олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $n=1-3$ к суммарной массе олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с $n=4-7$ составляет от 1,0 до 3,0.

9. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.1, в которой суммарная масса гулуриновой кислоты составляет 1-30%.

10. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по любому из пп.1-9, в которой массовое процентное содержание олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с различными степенями полимеризации составляет: дисахариды 5-25%, трисахариды 15-30%, тетрасахариды 15-28%, пентасахариды 10-25%, гексасахариды 5-15%, гептасахариды 3-10%, октасахариды 2-5%, нонасахариды 1-5%, декасахариды 1-5%.

11. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по п.10, в которой массовое процентное содержание олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, с различными степенями полимеризации составляет: дисахариды 10-20%, трисахариды 18-30%, тетрасахариды 15-28%, пентасахариды 15-20%, гексасахариды 5-10%, гептасахариды 3-5%, октасахариды 2-3%, нонасахариды 1-3%, декасахариды 1-3%.

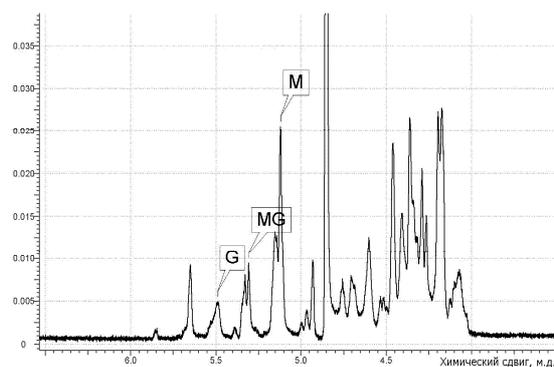
12. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по любому

из пп.1-11, в которой фармацевтически приемлемая соль является солью натрия или калия.

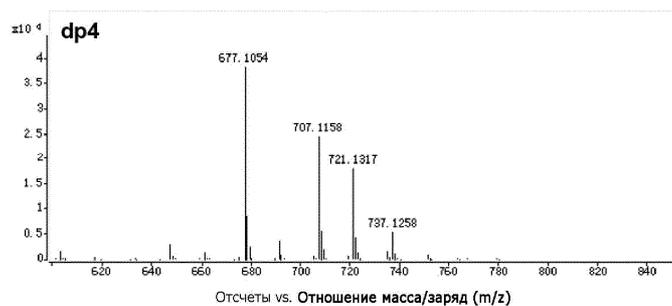
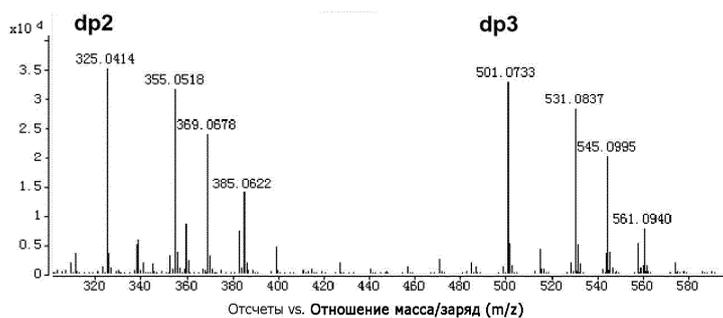
13. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество композиции олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по любому из пп.1-12 и подходящий носитель, где фармацевтическая композиция может представлять собой медицинский продукт.

14. Применение композиции олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по любому из пп.1-12 при изготовлении лекарственного средства или медицинского продукта для лечения болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, воспаления, боли, сахарного диабета или сосудистой деменции.

15. Композиция олигомерных сахарных дикислот, полученных из альгиновой кислоты, по любому из пп.1-12, пригодная для использования в качестве лекарственного средства или медицинского продукта.

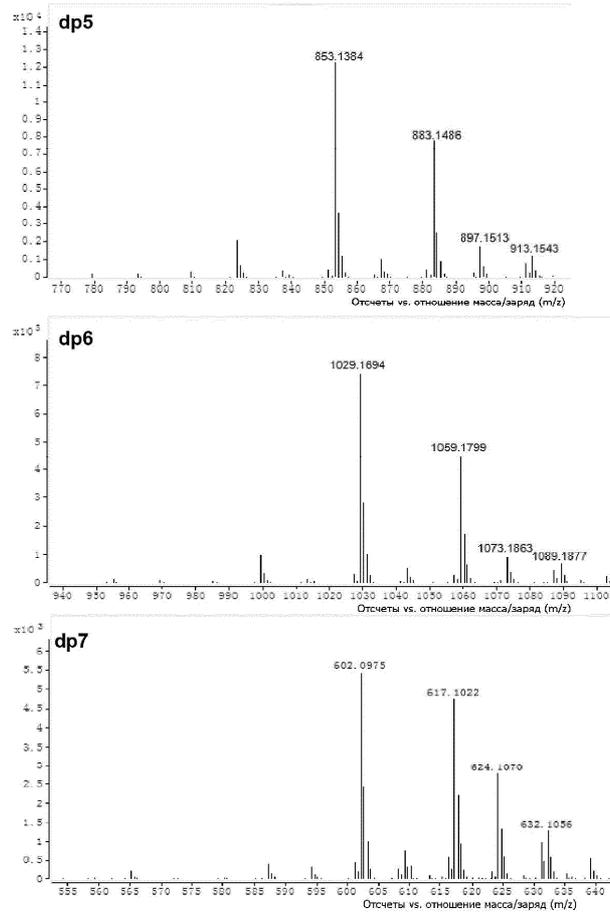


Фиг. 1



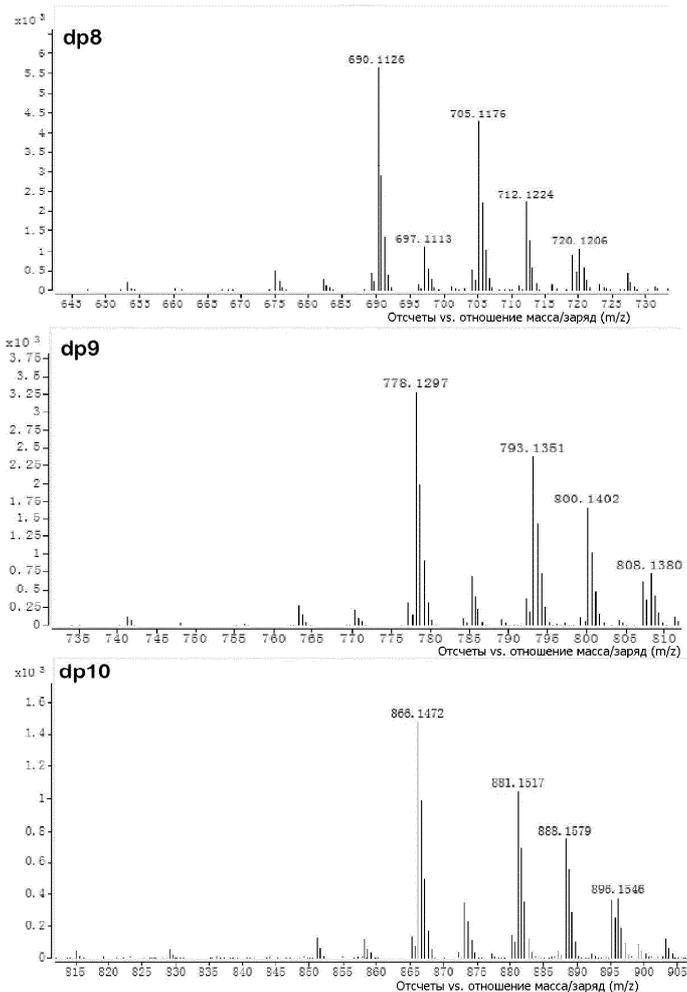
Фиг. 2

045761

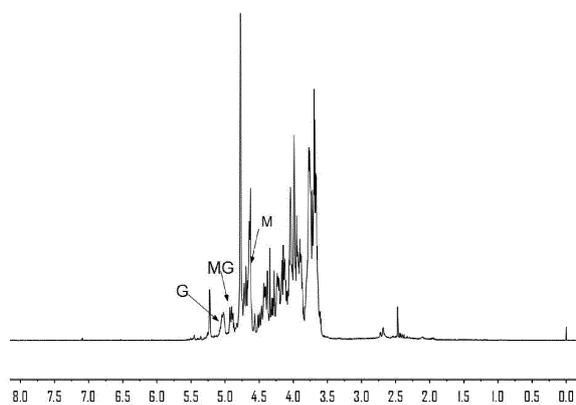


Фиг. 3

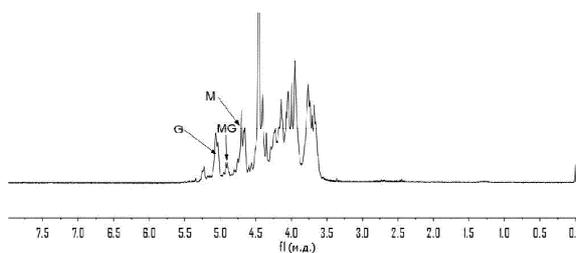
045761



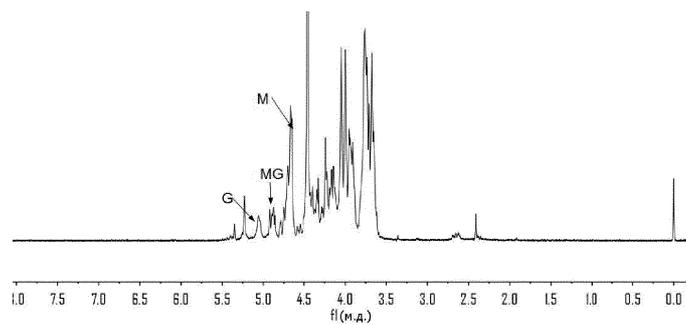
Фиг. 4



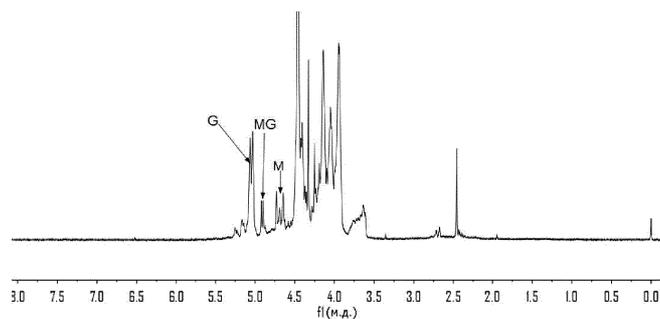
Фиг. 5



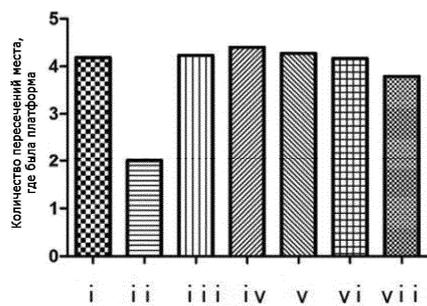
Фиг. 6



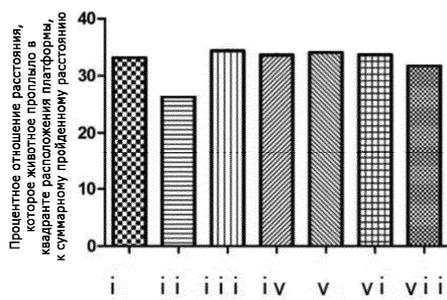
Фиг. 7



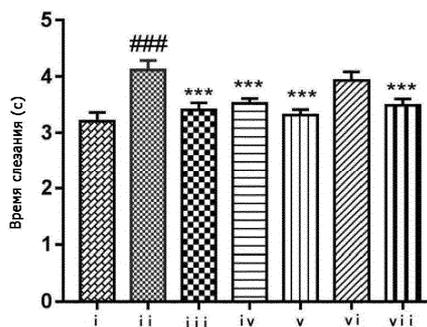
Фиг. 8



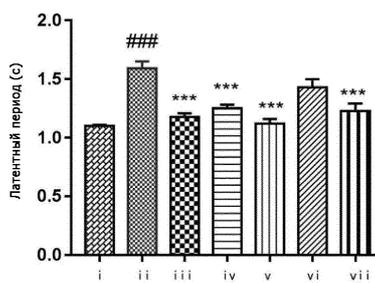
Фиг. 9



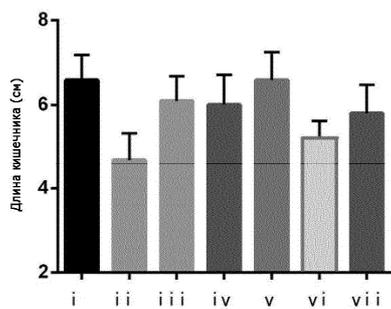
Фиг. 10



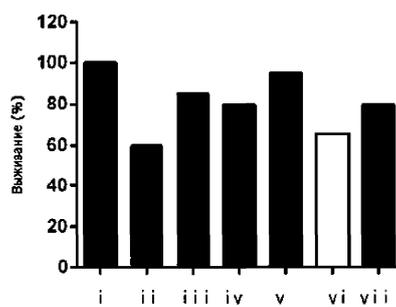
Фиг. 11



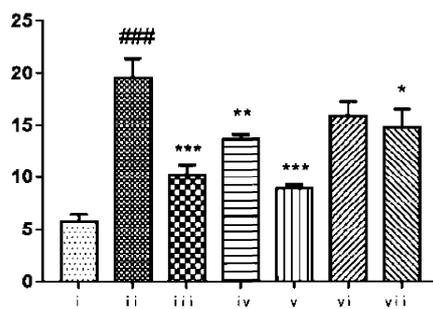
Фиг. 12



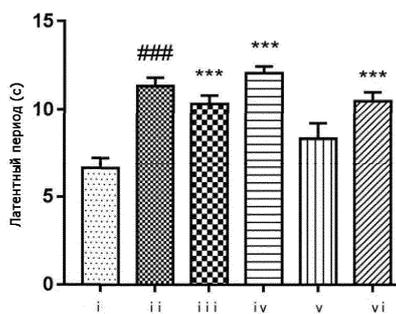
Фиг. 13а



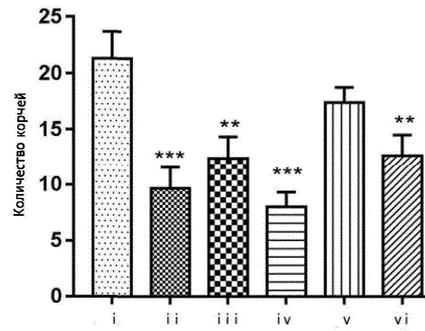
Фиг. 13b



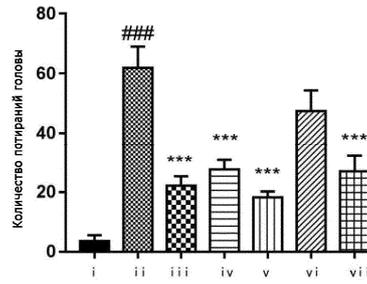
Фиг. 14



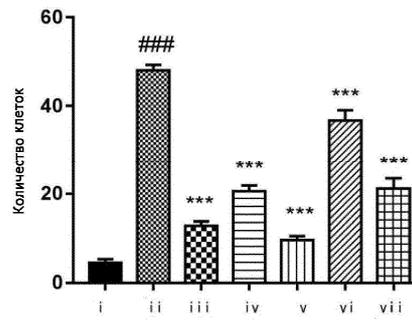
Фиг. 15



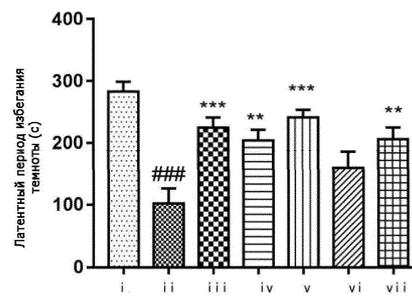
Фиг. 16



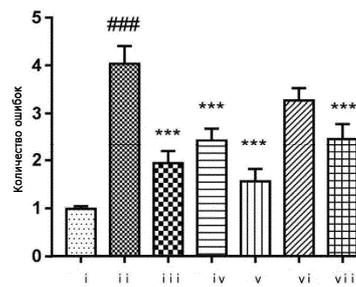
Фиг. 17



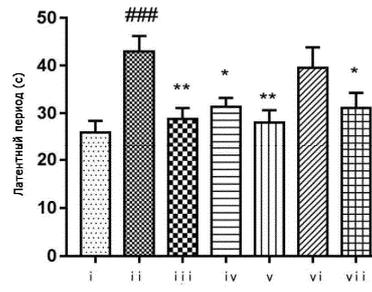
Фиг. 18



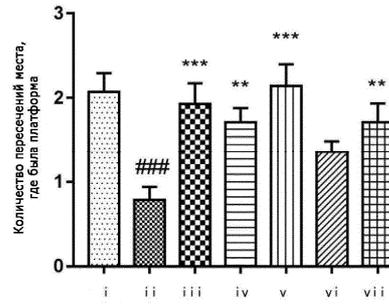
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22