



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129182** (13) **C2**
(51) МПК (2025.01)**A61K 31/702** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)**A61P 25/16** (2006.01)**A61P 29/00****A61P 25/04** (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

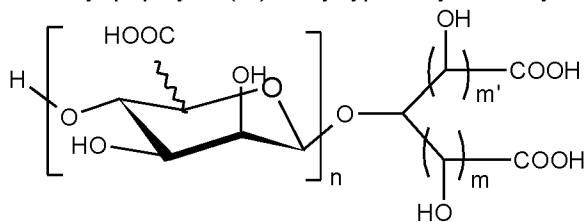
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2021 00189**
(22) Дата подання заявки: **28.06.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **06.02.2025**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **201810721327.6**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **29.06.2018**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **CN**
(41) Публікація відомостей про заявку: **03.03.2021, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **05.02.2025, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/CN2019/093778, 28.06.2019**

(72) Винахідник(и):
Генг Мейю (CN),
Женг Чженьцин (CN),
Джин Йінгшен (CN),
Ксяо Чжунпін (CN),
Дінг Цзянь (CN)
(73) Володілець (володільці):
ГРІН ВЕЛЛІ (ШАНХАЙ)
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО., ЛТД.,
Room 203, Section 102, Building 6, No.
393.421 Niudun Road, China (Shanghai) Pilot
Free Trade Zone, Pudong New Area,
Shanghai 200131, China (CN),
ШАНХАЙ ІНСТІТУТ ОФ МАТЕРІА
МЕДІКА, ЧАЙНІЗ ЕКЕДЕМІ ОФ САЄНСІЗ,
555 Zuchongzhi Road, Zhang Jiang Hi-Tech
Park, Pudong New Area, Shanghai 201203,
China (CN)
(74) Представник:
Шамріна Олена Олексіївна, реєстр. №141
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
CN 106344592 A, 25.01.2017
CN 106344593 A, 25.01.2017
CN 106344594 A, 25.01.2017
CN 106344595 A, 25.01.2017
CN 100508985 C, 08.07.2009
WO 2016/188382 A1, 01.12.2016

UA 129182 C2**(54) КОМПОЗИЦІЯ ОЛІГОСАХАРИДУ АЛЬГІНОВОЇ ДИКИСЛОТИ****(57) Реферат:**

Винахід стосується композиції олігосахариду альгінової дикислоти, що містить мануранову кислоту формули (IV) та гулуранову кислоту або її фармацевтично прийнятну сіль:



, формула (IV)

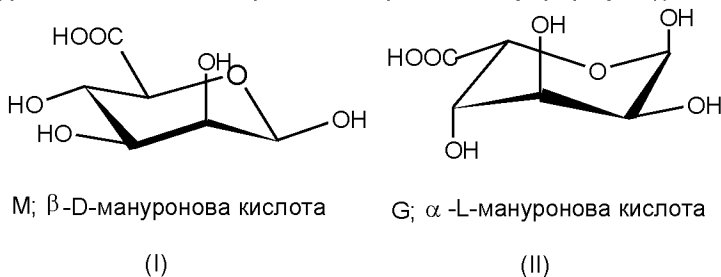
де n являє собою ціле число, вибране з від 1 до 9, m є вибраним з 0, 1 або 2, m' є вибраним з 0 або 1, та де загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-5$, становить не менше ніж 60 % від загальної маси композиції; та де загальна маса гулуранових кислот становить 0,1-50 % від загальної маси композиції; та де загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, в яких $m+m'=1$ та 2, становить не менше ніж 50 % від загальної маси композиції.

Представлений винахід стосується оптимальної композиції олігосахариду альгінових
дикислот, отриманої за допомогою способу скринінгу біологічної активності, в якому
використовується тваринна модель хвороби Альцгеймера, для оцінки впливу різних ступенів
полімеризації альгінових олігосахаридів та їх пропорцій на біологічну активність. В результаті
скринінгу є отриманою композиція з найкращою біологічною активністю, та бажана цільова
речовина є отриманою за способом ультрафільтраційного розділення мембран.

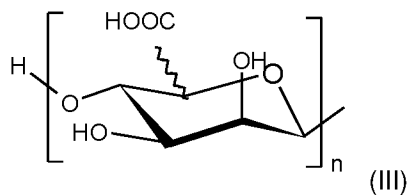
ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВИНАХОДУ

Альгіновим олігосахаридам приділялася велика увага через їх потенційну лікувальну
цінність. Альгінові олігосахариди, зазвичай є отриманими шляхом декількох стадій
використовуючи альгінову кислоту як вихідний матеріал.

У молекулах альгінових олігосахаридів вихідним матеріалом є сегмент М, утворений D-
мануроною кислотою, пов'язаною β -1,4-глюкозидними зв'язками, сегмент G, утворений L-
гулууроною кислотою, пов'язаною α -1,4-глюкозидними зв'язками та сегмент MG, утворений
шляхом гібридизації двох сахаридів. Структурні формули D-мануронової кислоти та L-
гулууронової кислоти є продемонстрованими у формулі (I) та формулі (II) нижче:



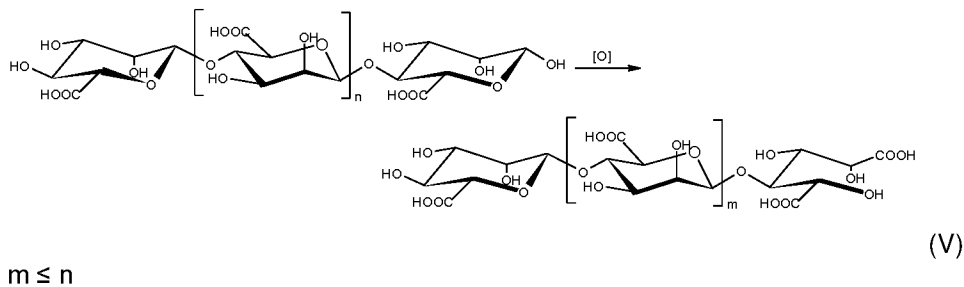
Структурна формула альгінових олігосахаридів є продемонстрована формулою (III) нижче:



Сегмент М та сегмент G можуть бути відокремленими від вихідного матеріалу, альгінових
кислот. Загальноприйнятий спосіб може бути просто описаним нижче: альгінова кислота є
попередньо розкладеною утворюючи змішані полісахариди полімануронової кислоти та
полігулууронової кислоти; потім змішані полісахариди є підданими кислотному осадженню для
видалення з них певної кількості полігулууронової кислоти. Дивись, наприклад, способи, розкриті
в китайських заявках на патент № 98806637.8 та CN02823707.2.

Спосіб отримання олігомерної мануронової кислоти є наступним: проміжна сполука М-
сегмента, отримана вище, може бути підданою додатковому ацидолізу шляхом нагрівання в
кислих умовах з отриманням невеликого фрагменту полімеру мануронової кислоти, що має
бажаний діапазон молекулярної маси. Крім того, ефективність розкладання може бути
підвищеною за допомогою способу окисного розкладу; в той же час відновлювальний кінець
може бути окиснений до цукрової дикислоти з розімкненим кільцем, подробиці дивись у
китайській заявці на патент № 200580009396.5 (патентна література 1), подану MeiYu Geng, et
al. та патенті США № 8,835,403 B2 (Патентна література 2). Для зручності опису патентна
література 1 та 2 тут і далі разом іменуються документами попереднього рівня техніки, які є
повністю включеними в представлений документ шляхом посилання.

Реакція отримання мануронової дикислоти, описана в документах попереднього рівня
техніки, може бути представлена наступним рівнянням реакції (V), тобто альдегідна група в
положенні C1 мануронової кислоти на відновлювальному кінці полісахариду олігомануронової
кислоти є окисненою до карбоксильної групи.



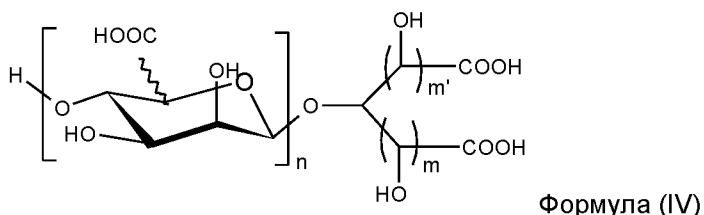
В описаному вище способі окиснюючого перетворення, як правило, окиснювачем, що застосовується є розчин лужного сульфату міді, тобто реагент Фелінга. У документах попереднього рівня техніки, застосовується зазначений спосіб окиснення. Зокрема, в лужних умовах, реакційний субстрат полімануранової кислоти, тобто вищезазначена проміжна сполука М-сегмента, є доданою до розчину сульфату міді, та підданою реакції на киплячій водяній бані протягом від 15 хвилин до 2 годин. У зазначеному способі іон Cu^{2+} застосовується як окиснювач для окиснення альдегідної групи, та в результаті реакції утворюється осад оксиду міді цегляно-червоного кольору. Зазначена реакція часто застосовується для визначення цукру, що редукує.

Документи попереднього рівня техніки розкривають, що олігоманарні кислоти діють проти хвороби Альцгеймера (AD) та цукрового діабету, та активність олігоманарних кислот зі ступенем полімеризації 6 є найкращою. Патогенез хвороби Альцгеймера та діабету 2-го типу є тісно пов'язаними з амілоїдами (β -амілоїд та амیلін). Амілоїдний протеїн агрегує, та потім продукує протеїнові олігомери, які в подальшому агрегують з утворенням волокон. Зазначені протеїнові агрегати є цитотоксичними, викликають окиснюючу реакцію в клітинах, пошкоджуючи мітохондрії, та запускають каскадну реакцію, таку як запальна реакція, викликаючи пошкодження великої кількості нейронів та β -клітин і, в кінцевому підсумку, приводячи до розвитку хвороби Альцгеймера і діабету 2-го типу. Олігоманарні кислоти націлені на амілоїдний протеїн та протидіють каскадним реакціям, індукованим амілоїдним протеїном, і, отже, мають профілактичну та лікувальну дію на хворобу Альцгеймера та діабету 2-го типу.

Для отримання олігоманарової кислоти, що має дію проти хвороби Альцгеймера та антидіабетичну дію, описану у документах попереднього рівня техніки, необхідно видалити гулуранову кислоту з вихідного матеріалу альгінової кислоти. Вміст гулуранової кислоти в альгіновій кислоті, зазвичай становить понад 30 %, максимально до приблизно 70 %. Таким чином, для отримання олігоманарової кислоти високої чистоти фактична вартість виробництва є дуже високою.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Перший аспект представленого винаходу стосується композиції олігосахариду альгінової дикислоти, що містить мануранову кислоту формули (IV) та/або гулуранову кислоту або їх фармацевтично прийнятні солі:



де n являє собою ціле число, вибране від 1 до 9, m є вибраним з 0, 1 або 2, m' є вибраним з 0 або 1,

та де,

загальна маса олігосахариду альгінової дикислоти, де $n=1-5$, становить більше ніж 60 % від загальної маси композиції; загальна маса гулуранової дикислоти становить менше ніж 50 % від загальної маси композиції.

Інший аспект представленого винаходу, стосується фармацевтичної композиції або лікарського засобу, який включає вищезазначену композицію олігосахариду альгінової кислоти. Інший аспект даного винаходу, також стосується застосування композиції олігосахариду альгінової кислоти для лікування захворювань, вибраних з хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, запалення, болю, цукрового діабету або судинної деменції.

Зокрема, композиція олігосахариду альгінової кислоти за представленим винаходом являє

собою суміш мануринової кислоти та гулуринової кислоти з різним ступенем полімеризації, та її основними компонентами є олігосахарид зі ступенем полімеризації від 2 до 10: сегмент М, утворений мануриновою кислотою, пов'язаною β -1,4-глюкозидними зв'язками, сегмент G, утворений гулуриновою кислотою, пов'язаною α -1,4-глюкозидними зв'язками, та сегмент MG, утворений шляхом гібридизації двох сахаридів. Відомо, що мануринові дикислоти мають певну фармакологічну активність проти хвороби Альцгеймера (AD) та цукрового діабету. Найбільш активними сахарами є пентасахариди та октасахариди, особливо гексасахариди. Проте, винахідники виявили, що дикислотна суміш олігосахариду мануринової кислоти та гулуринової кислоти зі ступенем полімеризації від 2 до 10, також має фармакологічну активність проти хвороби Альцгеймера (AD) та цукрового діабету, але передумова полягає в тому, що вміст гулуринової кислоти є контрольованим у визначеному діапазоні. Інакше кажучи, композиція олігосахариду альгінової дикислоти за представленим винаходом може бути отримана зі значно зниженими виробничими витратами, що полегшує реалізацію в реальному виробництві, та спрощує реалізацію промислового масового виробництва.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1 демонструє ЯМР-спектр проміжної сполуки.

Фігура 2 демонструє мас-спектри дисахариду, трисахариду та тетрасахариду у продукті А.

Фігура 3 демонструє мас-спектри пентасахариду, гексасахариду та гептасахариду у продукті А.

Фігура 4 демонструє мас-спектри октасахариду, нонасахариду та декасахариду у продукті А.

Фігура 5 демонструє ЯМР-спектр продукту А.

Фігура 6 демонструє ЯМР-спектр продукту В.

Фігура 7 демонструє ЯМР-спектр продукту С.

Фігура 8 демонструє ЯМР-спектр продукту D.

Фігура 9 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на кількість разів перетину платформи тваринами з AD. Зразки, що відповідають номерам на осі абсцис на Фігурі, є наступними: i: контрольна група; ii: модельна група; iii: продукт А; iv: продукт В; v: продукт С; vi: продукт D; vii: гексасахарид мануринової дикислоти.

Фігура 10 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на відстань плавання тварин з AD; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 11 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на час виходу тварин з PD на 11 день; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 12 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на інкубаційний період тварин з PD на 11 день; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

Фігури 13a та 13b демонструють терапевтичні ефекти різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на запальний ентерит у мишей; символи на абсцисі Фігури є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 14 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на рівень глюкози в крові після прийому їжі у мишей з діабетом; символи на абсцисі Фігури є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 15 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на період інкубації реакції корчів у мишей, викликані оцтовою кислотою; зразки, що відповідають номерам на осі абсцис на Фігурі є наступними: i: модельна група; ii: продукт А; iii: продукт В; iv: продукт С; v: продукт D; vi: гексасахарид мануринової дикислоти.

Фігура 16 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на кількість разів реакції корчів у мишей, викликані оцтовою кислотою; при цьому символи на осі абсцис на Фігурі є такими, як на Фігурі 15.

Фігура 17 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на кількість подряпин на голові у щурів з мігренню, викликану нітрогліцерином; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 18 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануринової дикислоти на кількість c-fos-позитивних клітин в каудальній частині (nucleus caudalis) спинномозкового ядра трійчастого нерва у щурів з мігренню, індукованою електричною стимуляцією ганглія трійчастого нерву; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 19 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануранової дикислоти на інкубаційний період в дослідженні на уникнення темряви у мишей з судинною деменцією, викликану двосторонньою оклюзією загальної сонної артерії; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 20 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануранової дикислоти на кількість помилок в дослідженні на уникнення темряви у мишей з судинною деменцією, викликану двосторонньою оклюзією загальної сонної артерії; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

Фігура 21 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануранової дикислоти на інкубаційний період виходу в дослідженні у водному лабіринті у мишей з судинною деменцією, викликану двосторонньою оклюзією загальної сонної артерії; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

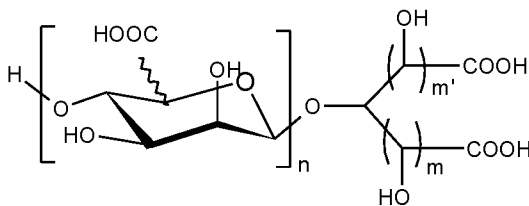
Фігура 22 демонструє вплив різних олігосахаридних композицій та гексасахариду мануранової дикислоти на кількість перетинів платформи у мишей з судинною деменцією, викликану двосторонньою оклюзією загальної сонної артерії; при цьому символи на абсцисі на Фігурі є такими, як на Фігурі 9.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Різні аспекти представленого винаходу будуть детально описані нижче, але даний винахід не обмежується цими конкретними варіантами здійснення. Фахівці в даній галузі техніки можуть внести деякі модифікації та коригування в представлений винахід відповідно до суттєвих розкриттів, наведених нижче, та зазначені коригування також знаходяться в межах обсягу представленого винаходу.

Композиція олігосахариду альгінової дикислоти

Перший аспект представленого винаходу стосується композиції олігосахариду альгінової дикислоти, що містить мануранову кислоту формули (IV) та/або гулуранову кислоту або її фармацевтично прийнятні солі:



Формула (IV)

де n являє собою ціле число вибране з від 1 до 9, m є вибраним з 0, 1 або 2, m' є вибраним з 0 або 1,

та де,

загальна маса олігосахариду альгінової дикислоти, де $n=1-5$, становить більше ніж 60 % від загальної маси композиції;

де загальна маса гулуранової дикислоти становить менше ніж 50 % від загальної маси композиції.

Композиція олігосахариду альгінової кислоти, за представленим винаходом являє собою суміш мануранової кислоти та гулуранової кислоти з різним ступенем полімеризації, та її основними компонентами є олігосахарид зі ступенем полімеризації від 2 до 10: сегмент M, утворений манурановою кислотою, пов'язаною β -1,4-глюкозидними зв'язками, сегмент G, утворений гулурановою кислотою, пов'язаною α -1,4-глюкозидними зв'язками, та сегмент MG, утворений за допомогою гібридизації двох сахаридів. Відповідно до документів попереднього рівня техніки, є відомим, що мануранові дикислоти мають певну фармакологічну активність проти хвороби Альцгеймера (AD) та цукрового діабету, де найбільш активними сахарами у манурановій дикислоті є пентасахарид та октасахарид, особливо гексасахарид. Проте, порівняно з відомим рівнем техніки, винахідники виявили, що дикислотна суміш олігосахариду мануранової кислоти та гулуранової кислоти зі ступенем полімеризації від 2 до 10, також має фармакологічну активність проти хвороби Альцгеймера (AD) та цукрового діабету, але вміст гулуранової кислоти необхідно контролювати у визначеному діапазоні.

У фактичному процесі отримання, вміст гулуранової кислоти в продукті після попереднього розкладання вихідної альгінової кислоти, як описано вище, зазвичай становить понад 30 % та максимально до приблизно 70 %. Якщо слідувати попереднім застосуванням, для отримання олігомануранової кислоти з високою активністю, гулуранова кислота повинна бути видаленою шляхом розділення в максимально можливому ступені. Проте, ґрунтуючись на

вищезазначеному відкритті винахідників, не потрібно розділяти та видаляти гулурунову кислоту з розкладеного продукту. Крім того, винахідники виявили, що, контролюючи частку гулурунової кислоти в певному діапазоні за допомогою контролю умов реакції кислотного осаджування, активність отриманої композиції може досягати або навіть бути кращою, ніж у гексасахариду олігоманарової кислоти, описаного в заявках попереднього рівня техніки. Крім того, оскільки немає необхідності видаляти гулурунову кислоту як домішок, вихід продукту є значно вищим, ніж вихід продукту, описаний в заявках попереднього рівня техніки. Таким чином, зазначене значно знижує вартість виробництва, зменшує скидання відходів, що спрощує реалізацію у фактичному виробництві та полегшує промислове великомасштабне виробництво.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти за представленим винаходом, загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-5$ становить від 80 до 95 % від загальної маси композиції, та загальна маса гулурунових кислот становить менше ніж 50 % від загальної маси композиції.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, співвідношення загальної маси олігосахариду альгінових дикислот з низьким ступенем полімеризації, де $n=1-3$, до загальної маси олігосахариду альгінових дикислот з низьким ступенем полімеризації, де $n=4-7$ становить від 1,0 до 3,5.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в олігосахаридній композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $m+m' = 1$ або 2, становить не менше ніж 50 % від загальної маси композиції, переважно від 60 % до 90 %, більш переважно від 70 % до 90 %. Зокрема, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $m+m' = 1$, становить не менше ніж 10 % від загальної маси композиції, переважно від 30 % до 40 %. В іншому переважному варіанті здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $m+m' = 2$, становить не менше ніж 10 % від загальної маси композиції, переважно від 30 % до 50 %.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-5$, становить від 80 % до 95 % від загальної маси композиції.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-3$, становить від 20 % до 70 % від загальної маси композиції.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, співвідношення загальної маси олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-3$, до загальної маси олігосахариду альгінових дикислот, де $n=4-7$, становить від 1,0 до 3,5, переважно від 1,0 до 3,0.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, масовий відсотковий вміст олігосахариду альгінових дикислот з кожним ступенем полімеризації у зазначеній вище композиції складає: дисахарид від 5 % до 25 %, трисахарид від 15 % до 30 %, тетрасахарид від 15 % до 28 %, пентасахарид від 10 % до 25 %, гексасахарид від 5 % до 15 %, гептасахарид від 3 % до 10 %, октасахарид від 2 % до 5 %, нонасахарид від 1 % до 5 %, декасахарид від 1 % до 5 %. Зокрема, в композиції, масовий відсотковий вміст олігосахаридів у зазначеній вище композиції складає: дисахарид від 10 % до 20 %, трисахарид від 18 % до 30 %, тетрасахарид від 15 % до 28 %, пентасахарид від 15 % до 20 %, гексасахарид від 5 % до 15 %, гептасахарид від 3 % до 5 %, октасахарид від 2 % до 3 %, нонасахарид від 1 % до 3 %, декасахарид від 1 % до 3 %.

Відповідно до переважного варіанту здійснення, в композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, загальна маса гулурунових кислот, де $n=1-3$, становить від 0,1 % до 50 % від загальної маси композиції, переважно від 1 % до 30 %.

У композиції олігосахариду альгінової дикислоти, за представленим винаходом, її фармацевтично прийнятна сіль являє собою натрієву сіль або калієву сіль.

Спосіб отримання композиції олігосахариду альгінової дикислоти

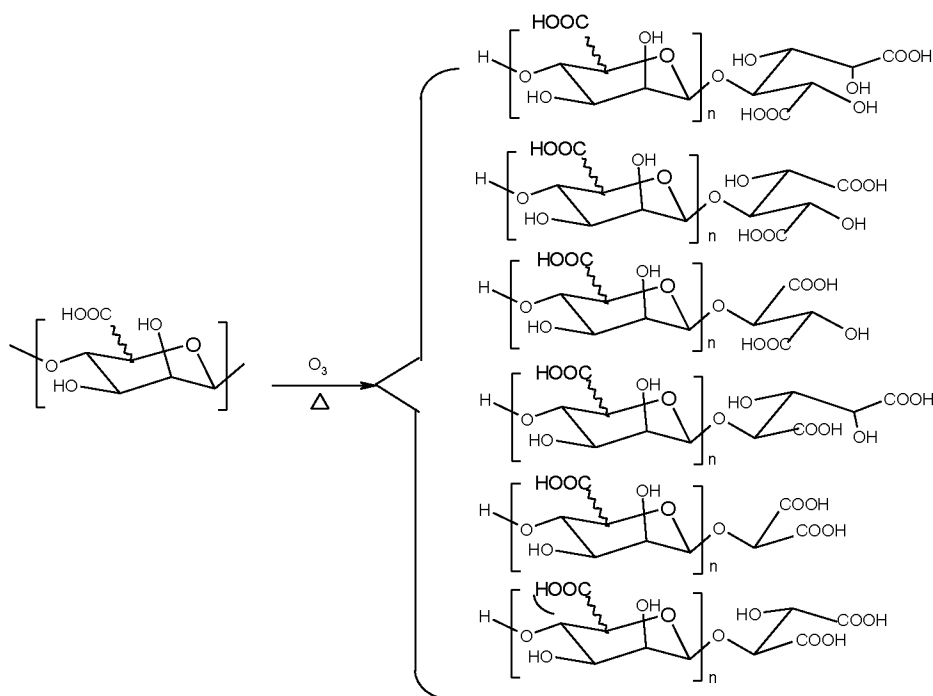
Процес отримання олігосахариду альгінової дикислоти за представленим винаходом є коротко описаним наступним чином:

Після попереднього розкладання альгінової кислоти, може бути отриманою суміш полісахариду поліманурунової кислоти та полігулурунової кислоти. Потім суміш полісахариду осаджують за допомогою кислотного способу для видалення певної кількості полігулурунової кислоти. В процесі осаджування за допомогою кислотного способу, чим вище рН, тим вищий вміст полігулурунової кислоти в отриманому змішаному полісахариді. Дивись, наприклад,

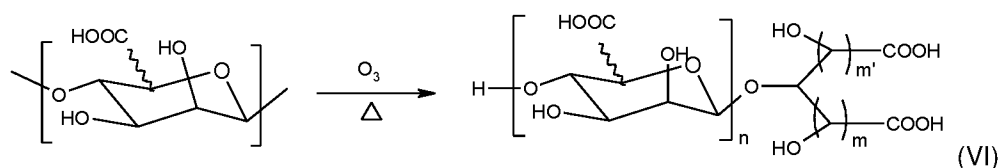
способи розкриті у китайських заявках на патент № 98806637.8 та CN02823707.2. У присутності окиснювача цукрові ланцюги вищезгаданого змішаного полісахариду піддаються окисному розкладанню, отримуючи окиснені олігосахариди з різним ступенем полімеризації. Окиснені олігосахариди характеризуються тим, що мануранова кислота або гулуранова кислота на відновлювальному кінці олігосахариду окиснюється до цукрової дикислоти з від 3 до 6 атомами вуглецю.

Окиснювачем, який є найбільш прийнятним для реакції за представленим винаходом, є озон. В процесі реакції може відбуватися реакція окисного розкладу цукрових ланцюгів, коли озон вводиться в розчин, що містить змішані полісахариди. Температура, при якій проводиться стадія окисного розкладу, переважно становить від 0 °C до 70 °C, більш переважно від 10 °C до 45 °C. Значення pH зазначеної вище стадії окисного розкладу становить 3-13, переважно 4-10, більш переважно 6-8.

Реакція окисного розкладу з використанням озону за представленим винаходом, кислотний гідроліз у присутності лужного сульфату міді (документ попереднього рівня техніки) або пероксиду водню та гіпохлориту натрію (китайська патентна заявка 01107952.5), що використовуються в попередньому рівні техніки, є загальноприйнятними, оскільки зазначені три способи можуть розкласти цукрові ланцюги. Різниця полягає в тому, що структура відновлювального кінця цукрового ланцюга продукту розкладання є іншою. Відновлювальний кінець продукту окисного розкладу мануранової кислоти або гулуранової кислоти, отримані відповідно до представленого винаходу, містить структуру дикислоти з від 3 до 6 атомів вуглецю. Крім того, спосіб, який застосовується на стадії окисного розкладу за представленим винаходом, має інші переваги: 1. умови реакції є м'якими та не потребують спеціальних умов реакції 2. Озон, що застосовується може бути отриманий на ділянці реакції, знижуючи тиск транспортування при промисловому виробництві; 3. після реакції, озон автоматично розкладається на кисень без небезпеки залишкових реагентів, які також не викликають забруднення навколишнього середовища. Процес реакції є продемонстрованим у наступному рівнянні (VI):



Зазначена вище реакція може бути спрощеною наступним чином:



На схематичній діаграмі вищенаведеного рівняння реакції (VI) та сполуки загальної формули (IV),

Олігосахариди, де $m=2$ та $m' = 1$, являють собою цукрові кислоти з 6 атомами вуглецю на кінці;

5 Олігосахариди, де $m=1$ та $m=1$ або $m' =2$ та $m' =0$ являють собою цукрові кислоти з 5 атомами вуглецю на кінці;

Олігосахариди, де $m=1$ та $m'=0$ або $m=0$ та $m' =1$ являють собою цукрові кислоти з 4 атомами вуглецю на кінці;

10 Олігосахариди, де $m=0$ та $m' =0$ являють собою цукрові кислоти з 3 атомами вуглецю на кінці.

У композиції загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-5$ становить від 80 % до 95 % від загальної маси композиції, загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-3$ становить від 20 % до 70 % від загальної маси композиції, де співвідношення загальної маси олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-3$, до загальної маси альгінових олігосахаридів, де $n=4-7$, становить від 1,0 до 3,5, переважно від 1,0 до 3,0. Загальна маса гулурунових кислот становить менше ніж 50 % від загальної маси композиції, переважно від 0,1 % до 50 %, найбільш переважно від 1 % до 30 %.

У прикладі здійснення, спосіб отримання за представленим винаходом включає наступні стадії:

20 (1) Отримання продуктів олігосахариду альгінової дикислоти:

Отримання змішаних полісахаридів поліманурунової кислоти та полігулурунової кислоти. Як описано вище, вихідний матеріал, який застосовується у представленому винаході, змішані полісахариди поліманурунової кислоти та полігулурунової кислоти, можуть бути отримані за допомогою способу, відомого з попереднього рівня техніки, наприклад, способів, розкритих в 25 китайських патентних заявках № 98806637.8 та CN02823707.2. Звичайний спосіб може бути просто описаний нижче: альгінова кислота є попередньо розкладеною утворюючи змішані полісахариди поліманурунової кислоти та полігулурунової кислоти. Після того, як змішані полісахариди є повторно підданими кислотному осадженню, вміст частини полігулурунової кислоти може бути регульованим для отримання змішаних полісахаридів поліманурунової 30 кислоти та полігулурунової кислоти.

Окиснюючий розклад озону. Змішані полісахариди розчиняють у відповідній кількості води та перемішують при кімнатній температурі або в умовах нагрівання. При постійному введенні озону починається реакція. Значення рН реакції може бути доведено до 3-13, переважно 4-10, більш переважно 6-8, шляхом додавання по краплях розведеної хлористоводневої кислоти або 35 розведеного розчину NaOH. Температура переважно є від 0 °C до 70 °C, більш переважно від 10 °C до 45 °C. Після завершення реакції, введення озону припиняють та рН доводять до нейтрального.

Розділення та очищення мембран. Отриманий вище продукт реакції є отриманим у вигляді розчину з концентрацією близько 10 % та молекулярну мембрану відокремлюють, для 40 видалення продуктів розкладу нижче моносахариду. Ретентан є зібраним. MWCO молекулярної відокремлюючої мембрани, що використовується становить від 1000 Да до 3000 Да, переважно 2000 Да. Зібрану рідину концентрують на роторному випарнику та сушать під вакуумом отримуючи суміш олігомерного альгінового олігосахариду. Після аналізу виявлено, що всі зазначені продукти являють собою композиції олігосахаридів від дисахариду до декасахариду із 45 вмістом, що знаходиться в певному діапазоні співвідношень. Приклади 1-3, наприклад демонструють зазначений спосіб.

(2) Порівняння активності олігосахаридних композицій

Фармакологічна активність олігосахаридної композиції за представленим винаходом одночасно порівнюється з гексасахаридом олігоманарової кислоти в попередньому 50 застосуванні. Результати демонструють, що фармакологічна активність олігосахаридної композиції за представленим винаходом, є значно вищою, ніж у гексасахариду олігоманарової кислоти в заявках попереднього рівня техніки. Не обмежуючись будь-якою теорією, вважається, що, коли співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції є вищим ніж 60 %, та загальна маса гулурунової кислоти становить менше ніж 50 % від маси композиції, композиція є 55 найактивнішою; але коли частка гулурунової кислоти перевищує 60 %, активність композиції також знижується.

Представлений винахід також стосується лікарського засобу або продукту для догляду за здоров'ям, який містить композицію альгінових олігосахаридів, як описано вище, та необов'язково фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт.

60 Як описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing

Company, 19th ed. (1995), способи отримання лікарських засобів на основі олігосахаридних композицій, що містять різні співвідношення активних інгредієнтів, є відомими або очевидними для фахівців в даній галузі техніки ґрунтуючись на описі представленого винаходу. Способи отримання фармацевтичної композиції включають включення відповідних фармацевтичних

5 ексципієнтів, носіїв, розріджувачів тощо.

Фармацевтичні препарати, за представленим винаходом є отриманими за відомими способами, включаючи способи звичайного змішування, розчинення або ліофілізації.

10 Фармацевтична композиція, за представленим винаходом є введеною пацієнтам різними шляхами, прийнятими для вибраного способу введення, такими як пероральний або парентеральний (внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, місцевий або підшкірний шлях).

Отже, композиція лікарського засобу, відповідно до представленого винаходу, у поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм (таким як інертний розчинник або їстівний носій) може бути введеною системно, наприклад перорально. Вони можуть бути вкладеними у желатинові капсули з твердою або м'якою оболонкою та можуть бути спресовані у таблетки. Для

15 перорального терапевтичного введення, активна сполука за представленим винаходом, може комбінуватися з одним або декількома ексципієнтами та застосовуватися у вигляді таблеток для проковтування, букальних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, круглих таблеток тощо. Такі композиції та препарати повинні містити щонайменше 0,1 % активної сполуки. Частка таких композицій та препаратів, як правило, може варіюватися, та може містити

20 від приблизно 1 % до приблизно 99 % маси даної стандартної лікарської форми. У таких терапевтично корисних композиціях кількість активної сполуки є такою, щоб можна було отримати ефективний рівень дозування.

Таблетки, пастилки, пігулки, капсули тощо, можуть також містити: зв'язуючі речовини, такі як трагакант, гуміарабік, кукурудзяний крохмаль або желатин; ексципієнти, такі як дикальцію фосфат; та розпушувачі, такі як кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, альгінова кислота тощо; змащувальні речовини, такі як стеарат магнію; та підсолоджувачі, такі як сахароза, фруктоза, лактоза або аспартам; або ароматизатори, такі як м'ята перцева, гаультерієва олія або вишневий ароматизатор. Коли стандартна лікарська форма являє собою

25 капсулу, на додаток до вищезазначених типів матеріалів, вона може також включати рідкий носій, такий як рослинна олія або поліетиленгліколь. Різні інші матеріали можуть бути присутніми як покриття або іншим чином модифікувати фізичну форму твердої стандартної лікарської форми. Наприклад, таблетки, пігулки або капсули можуть бути покриті желатином, воском, шелаком або цукром. Сиропи або еліксири можуть містити активні сполуки, сахарозу або фруктозу як підсолоджувачі, метилпарабен або пропілпарабен як консерванти, барвники та

35 ароматизатори (такі як вишневий ароматизатор або апельсиновий ароматизатор). Звичайно, будь-який матеріал, який використовується для отримання будь-якої стандартної лікарської форми, повинен бути фармацевтично прийнятним та нетоксичним у застосовуваній кількості. Крім того, активна сполука може бути включеною в препарати з уповільненим вивільненням та пристрої з уповільненим вивільненням.

40 Активна сполука також може бути введеною внутрішньовенно або внутрішньочеревно шляхом інфузії або ін'єкції. Може бути отриманим водний розчин активної сполуки або її солі, необов'язково із змішаною нетоксичною поверхнево-активною речовиною. Також можуть бути отримані диспергатори в гліцерині, рідкому поліетиленгліколі, триацетині та їх суміші та олії. У звичайних умовах зберігання та застосування, зазначені препарати містять консервант для

45 запобігання росту мікроорганізмів.

Фармацевтичні лікарські форми прийнятні для ін'єкції або інфузії, можуть включати стерильний водний розчин або диспергатор або стерильний порошок активних інгредієнтів (необов'язково інкапсульованих у ліпосоми), що включає препарати негайної дії прийнятні для

50 стерильних ін'єкційних або інфузійних розчинів або диспергаторів. У всіх випадках, кінцева лікарська форма повинна бути стерильною, рідкою та стабільною в умовах виробництва та зберігання. Рідкий носій може бути розчинником або рідким дисперсійним середовищем, включаючи, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь, рідкий поліетиленгліколь тощо), рослинну олію, нетоксичний гліцерид та їх прийнятні суміші. Відповідний рідкий стан може бути підтриманим, наприклад, за рахунок утворення ліпосом, за

55 рахунок підтримання необхідного розміру частинок у випадку диспергаторів або за рахунок використання поверхнево-активних речовин. Для запобігання появі мікроорганізмів можуть бути використані різні антибактеріальні та протигрибкові засоби (такі як парабени, хлорбутанол, фенол, сорбінова кислота, тімеросал тощо). У багатьох випадках переважно є включеними ізотонічні агенти, такі як цукри, буфери або хлорид натрію. Пролонговане всмоктування

60 композиції для ін'єкцій може бути досягнуто за допомогою композицій, які затримують

абсорбцію (наприклад, моностеарат алюмінію та желатин).

Стерильні ін'єкційні розчини отримують шляхом об'єднання необхідної кількості активної сполуки у прийнятному розчиннику з різними іншими інгредієнтами, перерахованими вище, за необхідності, з подальшою стерилізацією шляхом фільтрування. У випадку стерильних порошків для отримання стерильних ін'єкційних розчинів, переважними способами отримання є сушіння у вакуумі та спосіб ліофілізації, які будуть виробляти порошок активного інгредієнту плюс будь-які інші необхідні інгредієнти, присутні в попередньому стерильному відфільтрованому розчині.

Прийнятні тверді носії включають подрібнені тверді речовини (такі як тальк, глина, мікрокристалічна целюлоза, діоксид кремнію, оксид алюмінію тощо). Прийнятні рідкі носії включають воду, етанол або етиленгліколь або суміш вода-етанол/етиленгліколь, та комбінований лікарський засіб за представленим винаходом, можуть бути розчинені або дисперговані до ефективного вмісту, необов'язково за допомогою нетоксичної поверхнево-активної речовини. Ад'юванти (такі як ароматизатор) та додаткові протимікробні агенти можуть бути доданими для оптимізації властивостей для даного застосування.

Загущувачі (такі як синтетичні полімери, жирні кислоти, солі та складні ефіри жирних кислот, жирні спирти, модифікована целюлоза або модифіковані неорганічні матеріали) також можуть застосовуватися з рідкими носіями для формування покривних паст, гелів, мазей, мила тощо, які безпосередньо наносяться на шкіру користувачів.

Терапевтично необхідна кількість сполуки або її суміші залежить не лише від самої сполуки, але також від способів введення, природи захворювання, яке необхідно лікувати, та також віку і стану пацієнтів, і в кінцевому підсумку залежить від рішення присутніх лікарів або практикуючого лікаря.

Вищезазначені препарати можуть бути представлені в стандартній лікарській формі, яка являє собою фізично диспергуючу одиницю, що містить стандартну дозу, прийнятну для введення людям та іншим ссавцям. Стандартна лікарська форма може являти собою капсулу або таблетку, або ряд капсул або таблеток. Залежно від конкретного лікування кількість стандартної дози активного інгредієнта може варіюватися або регулюватися від приблизно 0,1 до приблизно 1000 мг або більше.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує фармацевтичну композицію або продукт медичного призначення, який включає композицію альгінових олігосахаридів за представленим винаходом та, за необхідності, відповідний носій.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує застосування композиції альгінових олігосахаридів для лікування хвороби Альцгеймера.

Ще один аспект представленого винаходу, забезпечує спосіб лікування пацієнтів, які страждають на хворобу Альцгеймера, який включає введення пацієнтам, які цього потребують, ефективної кількості композиції альгінових олігосахаридів за представленим винаходом.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує застосування композиції альгінових олігосахаридів для лікування хвороби Паркінсона.

Ще один аспект представленого винаходу, забезпечує спосіб лікування пацієнтів, які страждають на хворобу Паркінсона, який включає введення пацієнтам, які цього потребують, ефективної кількості композиції альгінових олігосахаридів за представленим винаходом.

Ще один аспект представленого винаходу, забезпечує застосування композиції альгінових олігосахаридів для лікування запалення.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує спосіб лікування пацієнтів, які страждають на запалення, який включає введення пацієнтам, які цього потребують, ефективної кількості композиції альгінових олігосахаридів за представленим винаходом.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує застосування композиції альгінових олігосахаридів для лікування больових реакцій.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує спосіб лікування пацієнтів, які страждають від болю, який включає введення пацієнтам, які цього потребують, ефективної кількості композиції альгінових олігосахаридів за представленим винаходом.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує застосування композиції альгінових олігосахаридів для лікування цукрового діабету.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує спосіб лікування пацієнтів, які страждають на цукровий діабет, який включає введення пацієнтам, які цього потребують, ефективної кількості композиції альгінових олігосахаридів за представленим винаходом.

Ще один аспект представленого винаходу, забезпечує застосування композиції альгінових олігосахаридів для лікування судинної деменції.

Інший аспект представленого винаходу, забезпечує спосіб лікування пацієнтів, які

страждають на судинну деменцію, який включає введення пацієнту, який цього потребує, ефективною кількістю композиції альгінових олігосахаридів за представленим винаходом.

Біль, згаданий в представленому винаході, включає різний біль, включаючи гострий біль, хронічний біль, невропатичний біль, післяопераційний біль, хронічний біль в попереку, кластерний головний біль, герпетичну невралгію, фантомний біль у кінцівках, центральний біль, зубний біль, резистентний до опіоїдів біль, вісцеральний біль, хірургічний біль, біль при травмах кісток, втому та біль під час пологів, біль, викликаний опіками, включаючи сонячний опік, післяпологовий біль, мігрень, стенокардію та біль, пов'язаний з сечостатевими шляхами (включаючи цистит), судинну біль, невралгію трійчастого нерву, міжреберну невралгію, біль після хірургічного розрізу, хронічний біль при фасції, біль у п'яті, м'язовий біль, біль в кістках, біль у суглобах, біль при раку, біль при не злоякісній пухлині тощо.

Запалення, згадане в представленому винаході, включає різні запалення, включаючи, але не обмежуючись цим, гостре запалення, хронічне запалення, судинне запалення, нейрозапалення, запалення центральної нервової системи (наприклад, розсіяний склероз, включаючи енцефаломієліт тощо), запалення периферичних нервів, артрит (такий як остеоартрит, сакроїлеїт тощо, псоріатичний артрит, ревматоїдний артрит тощо), анкілозуючий спондиліт, запальне захворювання кишківника (наприклад, хвороба Крона та виразкові запалення товстої кишки), запальні діабетичні виразки, системний червоний вовчак (запальні захворювання шкіри, такі як псоріаз, атопічний дерматит, екзема) тощо.

Композицію альгінових олігосахаридів за представленим винаходом отримують за способом, відмінним від відомого рівня техніки, в якому не потрібно розділяти сегмент М та сегмент G. Зазначене, значно знижує складність виробничого процесу та значно знижує вартість виробництва, та спосіб отримання включає просту реакцію, високий вміст активних інгредієнтів та відсутність залишкових реакційних реагентів. Шляхом досліджень доведено, що композиція альгінових олігосахаридів за представленим винаходом має потенціал до запобігання та лікування хвороби Альцгеймера, цукрового діабету, хвороби Паркінсона, різних запальних реакцій, болю та судинної деменції.

Тваринні моделі та оцінка фармакодинамічної активності

1. Тваринна модель для фармакодинамічної оцінки проти AD: одностороння шлуночкова ін'єкція А β була застосована для індукування моделі AD, та водний лабіринт Морріса був використаний для оцінки здатності до навчання та поведінки пам'яті у щурів моделі AD.

Самців щурів Wistar (кожен вагою від 180 г до 220 г) беруть та випадковим чином розділяють на групи: контрольна група імітації операції, модельна група, група дозування, по 14 тварин в кожній групі. Щурів анестезували внутрішньочеревною ін'єкцією пентобарбіталу натрію (40 мг/кг) та фіксували на стереотаксичному пристрої. Шкіру підготовлювали та дезінфікували в звичайному порядку, шкіру розрізали, оголювали брегми та визначали розташування ділянки CA1 гіпокампу в положенні "3,0 мм задньої брегми, 2,2 мм поруч з вістрем та 2,8 мм під твердою мозковою оболонкою" з посиланням на "Rat Brain Stereotactic Atlas" (BAO Xinming, SHU Siyun, Beijing, People's Medical Press, 1991, 28). У кожній модельній групі та групі дозування застосовували мікроінжектор для вертикального введення голки в череп в ділянці CA1 правого гіпокампу. 5 мкл конденсованого А β (А β 1-40 був приготований з розчином PBS в розчин 1,4 мг/мл, який інкубували в інкубаторі при 37 °C протягом 5 днів до утворення агрегованого стану) повільно вводили зі швидкістю потоку 1 мкл/хв. Після завершення ін'єкції, голку залишали на 5 хвилин для повної дифузії А β , та потім голку повільно витягували. Хірургічний розріз зашивали та щурів зігрівали, для того, щоб вони прокинулися. Контрольній групі вводили таку ж кількість стерилізованого PBS, та інші стадії були такими ж, як і вищенаведені. Відповідний лікарський засіб вводили за 7 днів до операції та продовжували вводити до кінця дослідження.

Дослідження у водному лабіринті Морріса проводили на 11-у добу після операції.

Дослідження навігації місця: кожна група щурів тренувалася один раз на день протягом 5 днів поспіль, тобто дослідження навігації місця. Час, необхідний тваринам, для пошуку платформи (тобто інкубаційний період виходу) був зареєстрованим. Якщо платформа була знайдена приблизно через 90 секунд, їх змушували підпливти до платформи по прямій, та стояти на платформі протягом 30 секунд, для стимулювання здатності до навчання та пам'яті.

Дослідження простору за допомогою зонду: через день після завершення дослідження навігації місця, платформа була видалена, і щури були поміщені у воду від точки входу, кількість разів, коли вони перетинали платформу, та відсоток пройденої відстані в квадранті, в якому розташовувалася платформа, відносно загальної відстані також реєструвалася. Оцінювали здатність до навчання та функцію пам'яті тварин.

2. Тваринна модель для фармакодинамічного оцінювання проти хвороби Паркінсона (PD)

Мишей випадковим чином розділяли на 8 груп: порожню контрольну групу, групу моделі

МРТР та групу дозування, по 14 тварин в кожній групі. Тварини були розділені на групи та лікарські засоби вводили в один день. Порожній контрольній групі та модельній групі МРТР внутрішньошлунково вводили фізіологічний розчин, та іншим групам вводили відповідні лікарські засоби один раз на день протягом 17 днів поспіль. Моделюючи лікарські засоби вводили з 6-го дня. Тваринам контрольної групи вводили 10 мл/кг фізіологічного розчину підшкірно, та іншим тваринам вводили підшкірно 25 мг/кг МРТР один раз на день протягом п'яти днів.

Поведінкові тести проводилися на 11-й, 14-й та 17-й дні відповідно. Голову миші обережно кладуть вгору на шорстку верхівку стрижня (діаметр 8 мм, висота 55 см). Час налаштування мишей від руху головою вгору до голови вниз є інкубаційним періодом (Т-подібний поворот), та час від руху мишей вниз до досягнення всіма кінцівками нижньої частини стрижня записували як час підйому вниз (Т -LA). Більше ніж 30 секунд будуть записані як 30 секунд. Кожну мишу тестували 5 разів, та результати усереднювали.

МРТР має вибіркочу деструктивну дію на дофамінергічні нейрони чорної субстанції. Тваринна модель, викликана МРТР, є найбільш класичною тваринною моделлю, аналогічною патологічним змінам та клінічним характеристикам хвороби Паркінсона людини. Основними симптомами PD є тремор у стані спокою, підвищена напруга м'язів, зменшення рухів тощо. Час розвороту та час спуску під час дослідження зі сходження на стрижень можуть представляти загальну активність та здатність мишей до координації.

3. Тваринна модель для фармакодинамічного оцінювання протизапальних реакцій

(1) Модель ревматоїдного артрити - мишача модель артрити індукованого колагеном

Були взяті самці мишей DBA/1 масою від 19 г до 22 г, та випадковим чином розділені на групи: контрольна група, модельна група та група дозування, по 8 мишей у кожній групі. За винятком порожньої контрольної групи, інших тварин імунно-сенсibiliзували шляхом підшкірної ін'єкції, 10 мг/кг емульсії бичачого, заповненого колагеном ад'юванта Фрейнда II типу (CII-CFA) в корінь хвоста в день 0, та 1,5 мг/кг ліпополісахариду (LPS) вводили внутрішньоочеревно на 23 день. Введення починали на 28 день: порожній контрольній групі та модельній групі перорально вводили фізіологічний розчин, та іншим групам вводили відповідний лікарський засіб (один раз на день протягом 14 днів поспіль). Після ін'єкції LPS, за мишами щодня спостерігали на предмет хворобливих станів. Коли у мишей починало розвиватися захворювання (поява клінічних симптомів артрити), в залежності від різних ступенів захворювання (почервоніння, деформація суглобів) та ґрунтуючись на стандарті 0-4 бали, для відображення ступеня прогресування захворювання, проводилася клінічна оцінка. 0 означає відсутність еритеми та набряку; 1 означає виникнення еритеми або легкого набряку біля передплесних кісток, або біля гомілковостопних суглобів, або плеснових кісток, та почервоніння та набряк на одному пальці ноги; 2 означає легку еритему та набряк гомілковостопних суглобів та плеснових кісток, або почервоніння та набряк більше ніж на двох пальцях ніг; 3 означає помірну еритему та набряк гомілковостопних суглобів, променезап'ясткових суглобів та плеснових кісток; 4 означає сильне почервоніння та набряк всіх гомілковостопних суглобів, променезап'ясткових суглобів, плеснових кісток та пальців ніг; найвища оцінка для кожної кінцівки становить 4 бали, та найвища оцінка для кожної тварини становить 16 балів.

(2) Модель розсіяного склерозу - мишача модель розсіяного склерозу, індукованого MOG.

Були взяті самки мишей C57BL/6 з масою від 17 г до 20 г, та 5 з них були випадковим чином вибрані як порожня контрольна група. Решта тварин була імунно-сенсibiliзованою шляхом підшкірної ін'єкції емульсією ад'юванта Фрейнда, з повним глікопротеїном мієлінових олігодендроцитів (MOG-CFA), у спину в день 0 (10 мг/кг MOG, 20 мг/кг CFA) та в день 0 та день 2, внутрішньоочеревно вводили 10 мкг/кг коклюшного токсину. Введення було розпочато в 1-й день. Порожній контрольній групі та модельній групі перорально вводили фізіологічний розчин, та іншим групам вводили відповідний лікарський засіб (один раз на день протягом 24 днів поспіль). Приблизно через 12 днів після імунізації у імунізованих мишей розвинулися симптоми. Почали ретельне щоденне спостереження та реєстрацію їх ваги та клінічної оцінки, для відображення ступеню прогресування захворювання. 0-4 бали застосовуються для позначення різних ступенів: 0 означає нормальний зовнішній вигляд без явних ознак захворювання; 1 означає пониклий та слабкий хвіст та односторонню слабкість задніх кінцівок; 2 означає пониклий та слабкий хвіст, слабкість обох задніх кінцівок та хитливу ходу; 3 бали означає слабкість та односторонній параліч задньої кінцівки; 4 означає слабкість та параліч обох задніх кінцівок.

(3) Модель системного червоного вовчача - мишача модель MRL/lpr системного червоного вовчача

Трансгенні миші MRL/lpr, що мають гомозиготні мутації гену Fas^{lpr}, можуть спонтанно утворювати гіперплазію лімфоїдної тканини. Симптоми системного червоного вовчача у мишей,

почали проявлятися приблизно у віці 10-14 тижнів. Самок трансгенних мишей MRL/lpr (вік 9 тижнів) випадковим чином розділяли на групи: порожня контрольна група, група дозування, по 8 мишей в кожній групі. Порожній контрольній групі давали фізіологічний розчин перорально, та іншим групам давали відповідний лікарський засіб (один раз на день протягом 4 тижнів поспіль).

5 Оцінка лімфатичних вузлів проводилася один раз на тиждень. 0-6 балами позначають різні ступені: 0 означає нормально; 1 означає менше ніж 1 см в діаметрі в одній точці з обох сторін; 2 означає менше ніж 1 см в діаметрі в двох точках з обох сторін; 3 означає менше ніж 1 см в діаметрі в трьох точках з обох сторін; 4 означає більше ніж 1 см в діаметрі в одній точці з обох сторін та менше ніж 1 см в діаметрі в двох інших точках з обох сторін; 5 означає більше ніж 1 см в діаметрі в двох точках з обох сторін та менше ніж 1 см в діаметрі в іншому місці з обох сторін; 6 означає більше ніж 1 см в діаметрі в трьох точках з обох сторін.

(4) Модель запального захворювання кишківника (IBD) – мишача модель коліту, індукованого декстрансульфатом натрію (DSS)

15 Були взяті самки мишей C57 (вік 7-8 тижнів) вагою від 18 г до 20 г та випадковим чином розділені на групи: порожня контрольна група, модельна група та група дозування, по 8 мишей в кожній групі. Мишам в модельній групі та групі дозування вводили 2,5 % високомолекулярний полімер декстрансульфату натрію (DSS) у вигляді питної води в дні 1-7, та введення починали у день 1. Контрольній групі та модельній групі вводили фізіологічний розчин перорально, та іншим групам вводили відповідний лікарський засіб (один раз на день протягом 30 днів поспіль).

20 На 31 день мишей умертвляли шляхом зсуву шийних хребців, відкривали черевні порожнини та розділяли брижі. У кожної миші була взята частина від початку ілеоцекальної ділянки до кінця анусу. Кожна група була відібрана послідовно. Була виміряна довжина товстої кишки.

4. Тваринна модель для фармакодинамічної оцінки проти цукрового діабету.

25 Застосовували самців мишей NIH та випадковим чином розділяли на нормальну контрольну групу, модельну групу та групу дозування, по 10 в кожній групі. У день випробування, за винятком нормальної групи, перезавантаженим тваринам внутрішньочеревно вводили 150 мг/кг стрептозоцину. Відповідний лікарський засіб безперервно вводили протягом 10 днів. На 11 день видаляли очні яблука та брали кров для вимірювання концентрації глюкози в крові.

5. Тваринна модель для фармакодинамічної оцінки знеболювання

30 (1) Модель мишачого болю, індукованого оцтовою кислотою

35 Мишей Kunming, половина з яких самці та половина самки, вагою від 18 г до 22 г, випадковим чином розділяли на групи: порожня контрольна група, модельна група та група дозування, де в кожній групі було по 10 мишей. Починаючи з дня групування, порожній контрольній групі внутрішньошлунково вводили 20 мл/кг дистильованої води один раз на день протягом 7 днів поспіль, та іншим групам внутрішньошлунково вводили відповідні лікарські засоби один раз на день протягом 7 днів поспіль. Через годину після останнього введення, мишам в кожній групі внутрішньочеревно вводили 0,2 мл 0,6 % розчину оцтової кислоти, та також реєстрували період інкубації корчі (час від ін'єкції оцтової кислоти до появи реакції корчі) та кількість разів корчі у мишей протягом 20 хвилин після ін'єкції оцтової кислоти.

40 Ін'єкція хімічних речовин, таких як розчин оцтової кислоти, в черевну порожнину мишей, може стимулювати очеревину мишей та викликати періодичний стійкий біль, який проявляється у вигляді поглиблення живота, прилягання передньої стінки живота до дна корпусу, викривлення сідниць та розгинання задніх кінцівок, що показує особливу позу, так звану реакцією корчів. Інкубаційний період корчів (час від ін'єкції оцтової кислоти до появи корчів) та кількість корчів протягом певного періоду часу можуть відображати тяжкість болю. Чим коротший інкубаційний період корчів та чим більше їх повторюється, тим сильнішим є біль.

(2) Модель щурячої мігрені, викликані нітрогліцерином

50 Самців щурів SD масою від 180 г до 220 г випадковим чином розділяли на групи: порожню контрольну групу, модельну групу та групу дозування, причому в кожній групі було по 8 щурів. Введення було розпочато в день групування. Порожній контрольній групі та модельній групі внутрішньошлунково вводили дистильовану воду один раз на день протягом 28 днів поспіль, та іншим групам внутрішньошлунково вводили відповідні лікарські засоби один раз на день протягом 28 днів поспіль. Через 30 хвилин після останнього введення тваринам, за винятком порожньої контрольної групи, вводили фізіологічний розчин, та іншим групам підшкірно в праве плече вводили 10 мг/кг нітрогліцерину для створення моделі. Спостерігали час появи та тривалість почервоніння вух у щурів після моделювання, та також кількість подряпин на голові протягом 30-45 хвилин після моделювання. Вміст 5-HT в мозковій тканині визначали за допомогою флуоресцентної спектрофотометрії та вимірювали при довжині хвилі Ex356 нм/Em 483 нм. Результат є відображенням в нг/г ваги мозку.

60 Мігрень являє собою порушення функції кровоносних судин та нервів через взаємодію

кровеносних судин та нервових механізмів. Нітрогліцерин може викликати гіперчутливість волокон трійчастого нерва та викликати мігрень за рахунок розширення кровеносних судин мозкових оболонок, формування нейрогенного запалення та активації функцій нейронів гіпоталамуса, стовбура головного мозку та спинного мозку. Модель нітрогліцерину являє собою тваринну модель, створену в 1995 році та яка на сьогоднішній день стала класичною тваринною моделлю мігрені. Відповідно до патогенетичних механізмів нітрогліцерину, визначали час почервоніння вух, викликаного розширенням судин, кількість розчісувань на голові, викликаних болем, та вміст серотоніну (5-HT) (больовий фактор в тканині мозку), що застосовуються для оцінки ступеня тяжкості мігрені. Чим довше триває почервоніння вух, чим частіше свербить голова та чим вищий вміст 5-HT, тим сильнішою є мігрень.

(3) Модель щурячої мігрені, викликані електричною стимуляцією ганглію трійчастого нерву

Щури SD у віці 5 місяців, самці, масою від 200 г до 240 г, були випадковим чином розділені на групи: порожню контрольну групу, групу імітації операцій, модельну групу, групу дозування, де в кожній групі було по 10 щурів.

Кожній групі перорально вводили відповідні лікарські засоби, та контрольній групі, групі імітації операцій та модельній групі перорально вводили дистильовану воду. Після безперервного введення протягом 10 днів всіх щурів, за винятком порожньої контрольної групи, анестезували внутрішньочеревною ін'єкцією хлоралгідрату 350 мг/кг. Щурів фіксували на стереотаксичному апараті та робили середній розріз на маківці голови. Шкіру та м'язи розрізали шар за шаром, щоб оголити череп в середині сагітального шва. За допомогою стоматологічного свердла, зробили отвір на 3 мм ззаду та на 3 мм від брегми з подальшим введенням електроду у ганглію трійчастого нерву (глибина від твердої мозкової оболонки 9,5 мм). Після операції, анестезія була продовжена. Всі операції проводилися в стерильних умовах. Електроди стимуляції були налагоджені. Параметри електростимуляції являли собою цикл 200 мс, амплітуда 10 вольт та ширина хвилі 5 мс для 10-хвилинної стимуляції. У групі імітації операції, вставляли лише електроди, але не проводили стимуляції. 50 мг/кг Evans Blue вводили в праву стегнову вену за 7 хвилин до стимуляції з подальшою перфузією та фіксацією протягом 20 хвилин після стимуляції.

Через п'ять хвилин після закінчення стимуляції лівий шлуночок перфузували протягом 2 хвилин. Була проведена краніотомія, та весь мозок видалений, зафіксований для визначення c-fos в патологічному відділі за допомогою імуногістохімічного дослідження. Також було визначено положення електрода, та тверда мозкова оболонка в місці введення електрода, та відповідна частина іншої півкулі головного мозку були розділені з наступним промиванням деіонізованою водою, розподілом її на предметному склі, сушінням при 37 °C протягом 15 хвилин, та фіксацією 70 % гліцерином. Інтенсивність флуоресценції позначеної ділянки на стороні стимуляції та на контрольній стороні є детектованою під конфокальним мікроскопом з довжиною хвилі збудження 647 нм та довжиною хвилі випромінювання 680 нм. Співвідношення інтенсивності флуоресценції на стороні стимуляції/на контролюючій стороні є розрахованим, для зазначення екстравазації білку плазми (PPE). Отримували суцільні заморожені коронарні зрізи всього мозку з товщиною зрізу 10 мкм та c-fos-позитивні клітини були помічені імуногістохімічною флуоресценцією. 5 полів були випадковим чином вибрані під конфокальним мікроскопом для визначення кількості позитивних клітин на експериментальній стороні та на контрольній стороні в каудальній частині ядра трійчастого нерву спинного мозку, та потім середнє з 5 полів було прийнято як середня кількість позитивних клітин.

Активация нервово-судинної системи трійчастого нерва відіграє ключову роль у виникненні болю у пацієнтів з мігренню, та нейрозапалення мозкових оболонок відіграє важливу роль у виникненні та підтриманні болю при мігрені. Коли стимулюється трійчастий нерв, розподілений у твердій мозковій оболонці, він вивільняє вазоактивні речовини, викликаючи менінгеальне розширення кровеносних судин, екстравазацію компонентів плазми, дегрануляцію тучних клітин та активацію тромбоцитів, що призводить до мігрені. Крім того, нейромедіатор, що вивільняється після стимуляції болю, зв'язується з відповідними рецепторами на клітинній мембрані. Під дією другого месенджера ген мРНК c-fos експресується, транскрибується та синтезується в ядрі в білок c-fos, що призводить до довгострокового фізіологічного впливу на організм. Отже, під час виникнення мігрені кількість клітин, що експресують мРНК c-fos та білок c-fos, у ядрі спинномозкового шляху та у великому шві трійчастого нерва збільшується. Отже, ступінь мігрені може бути відображений шляхом вимірювання кількості сироваткового протеїну, виділеного з твердої мозкової оболонки тварин з мігренню, та кількості c-fos-позитивних клітин в каудальній частині (каудальному ядрі) ядра трійчастого нерва спинного мозку. Чим менша кількість клітин, тим менш вираженою є мігрень.

6. Тваринна модель для фармакодинамічної оцінки протисудинної деменції

(1) Мишача модель з судинною деменцією, викликаною двосторонньою оклюзією загальної сонної артерії (ВССАо).

Модель двосторонньої оклюзії загальної сонної артерії (ВССАо) являє собою широко застосовувану модель судинної деменції в області обумовлених глобальною церебральною ішемією та реперфузією.

1.1 Групування тварин та введення

Були вибрані самці мишей C57BL/6, масою 22 ± 2 г та випадковим чином розділені на групи: група імітації операції, модельна група 30-хвилинної двосторонньої оклюзії загальної сонної артерії (ВССАо) (скорочено група 30-хвилинної ВССАо) та група дозування, де в кожній групі було 10 тварин. Після того, як тварини були розділені на групи, мишам в групі імітації операції та групі 30-хвилинної ВССАо внутрішньошлунково вводили дистильовану воду один раз на день протягом 5 днів поспіль з подальшою операцією ВССАо. Мишам в групі дозування внутрішньошлунково вводили відповідні лікарські засоби один раз на день протягом 5 днів поспіль з подальшою операцією ВССАо. Операція ВССАо полягала в анестезії кожної групи мишей пентобарбіталом натрію; розділені та закупорюванні двосторонніх загальних сонних артерій мишей в модельній групі та групі дозування на 30 хвилин, потім видалення оклюзії та зашиття рани на шиї. У групі імітації операції, двосторонні загальні сонні артерії не були оклюзовані після розподілення, та розріз шиї був безпосередньо зашитий. Через 24 години після ВССАо, мишам в кожній групі продовжували внутрішньошлунково вводити відповідні лікарські засоби або дистильовану воду відповідно до передопераційного графіку дозування протягом наступних послідовних 23 днів введення. Дослідження на уникнення темряви виконували на 7-й день після ВССАо, та дослідження у водному лабіринті Морріса починали на 13-й день, для оцінювання покращеного ефекту композиції мануранової дикислоти на здатність мишей до навчання та пам'яті. Після дослідження поведінки, мишей умертвляли та фіксували тканини мозку. Пошкодження нейронів у гіпокампі мишей після ВССАо та захисний ефект композиції мануранової дикислоти на пошкоджені нейрони були оцінені за способами такими, як фарбування HE.

1.2 Дослідження на уникнення темряви

Дослідження на уникнення темряви застосовується для перевірки здатності мишей до навчання та запам'ятовування просторової дискримінації. Порушення пам'яті просторового позиціонування може з'явитися тільки при пошкодженні гіпокампу або зони навколо гіпокампу. Експериментальна скринька для уникнення темряви являє собою прилад, який розроблений для застосування у мишей звички стежити за темрявою та уникати світла. Половина скриньки являє собою темну кімнату, а інша половина являє собою світлу кімнату з невеликим отвором посередині для підключення. Дно темної кімнати є покритим мідною сіткою. Тварини є шокованими, коли вони входять в темну кімнату, та тікають назад до світлої кімнати. Після тренування тварин протягом 24 годин дослідження проводять знову. Інкубаційний період в дослідженні на уникнення темряви означає час з моменту розміщення тварини в світлу кімнату до першого входу в темну кімнату. Чим довшим є інкубаційний період в дослідженні на уникнення темряви, та чим меншою є кількість помилок уникнення, тим кращою є пам'ять тварини.

1.3 Аналіз поведінки у водному лабіринті Морріса

Дослідження у водному лабіринті Морріса (MWM) являє собою експеримент, в якому піддослідних тварин змушують плавати та вчитися знаходити платформи, заховані у воді. Він в основному застосовується для перевірки здатності піддослідних тварин до навчання та пам'яті з точки зору просторового положення та напрямку (просторове позиціонування). Водний мишачий лабіринт Морріса в основному складається з циліндричного басейну діаметром 80 см та висотою 70 см та рухомої платформи діаметром 8 см. Цифрова камера в небі над басейном є підключеною до комп'ютера. Перед дослідженням в басейн заздалегідь наливають чисту воду. Глибина води становить 15 см, та поверхня води знаходиться на 0,5 см над поверхнею платформи. Щоб зробити воду в басейні непрозорою, додають молоко. Положення платформи під час дослідження залишається незмінним. Поведінка в водному лабіринті Морріса включає наступні два дослідних індикатора.

Дослідження навігації місця використовується для вимірювання здатності мишей вивчати водний лабіринт та запам'ятовувати. Дослідження було розпочато на 13-й день після ВССАо та тривало 4 дні. Мишей тренували один раз вранці та вдень, всього 8 разів. Під час тренування миша входить в басейн на 1/2 дуги в західному квадранті та входить у воду головою до стіни басейну. Якщо платформа не буде знайдена протягом 120 секунд, дослідний персонал проведе мишу до платформи та залишить на 30 секунд, щоб скерувати її здатність до навчання та пам'ять. Маршрутна карта та час, необхідний мишам, щоб знайти платформу та піднятися на

неї, спостерігаються та записуються, тобто реєструються інкубаційний період їх виходу та швидкість плавання під час дослідження у водному лабіринті Морріса. Інкубаційний період виходу у дослідженні з водним лабіринтом Морріса стосується часу, коли миша входить у воду, щоб знайти платформу. Чим коротшим є інкубаційний період виходу у дослідженні у водному лабіринті Морріса, тим кращою є пам'ять тварини.

Дослідження простору за допомогою зонду застосовується для вимірювання здатності мишей зберігати пам'ять про просторове розташування платформи після тренування з пошуку платформи. Після завершення дослідження навігації місця, платформу видаляли з інтервалом в 1 день. Мишей поміщали у воду з однієї і тієї ж точки входу та вимірювали кількість разів, коли вони перетинали вихідну платформу. Збирання та обробка даних виконувалися за допомогою системи автоматичного моніторингу та обробки зображень.

(2) Щуряча модель з судинною деменцією, викликаною оклюзією середньої мозкової артерії (MCAO)

Модель оклюзії середньої мозкової артерії (MCAO) являє собою модель судинної деменції, широко застосовувану в області, обумовленій осередковою церебральною ішемією.

2.1 Групування тварин та введення

Були вибрані самці щурів Wistar та випадковим чином розділені на групи: порожня контрольна група, група імітації операції, модельна група (група MCAO) та група дозування, де в кожній групі було 10 тварин. Тваринам в порожній групі, групі імітації операцій та групі MCAO, перорально вводили дистильовану воду, та групі альгінових олігосахаридів перорально вводили відповідну дозу альгінового олігосахариду. Після 7 днів безперервного введення в кожній групі, за винятком щурів у порожній групі, щурів в інших групах анестезували внутрішньочеревною ін'єкцією хлоралгідрату 350 мг/кг та фіксували на дошці для щурів в лівому бічному положенні. Під операційним мікроскопом шкіра була розсічена по середній точці з'єднання між зовнішнім слуховим проходом та очним дном, для оголення скулової дуги. Відстань між фосфатною кісткою та нижньою щелепою розширили за допомогою невеликого дистрактора. В основі черепа було відкрито кісткове вікно розміром 2 × 2 мм. Тверда мозкова оболонка була відкритою, щоб оголити середню мозкову артерію, та одна сторона середньої мозкової артерії була коагульованою високочастотною електрокоагуляцією, щоб викликати локальну церебральну ішемію (тваринам в групі імітації операції оголили лише середню мозкову артерію без коагуляції). Розріз був зашитий пошарово. Кімнатні температури під час та після операції суворо контролювалися на рівні 24 ~ 25 °C. Після операції, відповідно до передопераційного графіку дозування, кожній групі продовжували вводити лікарський засіб або дистильовану воду. Дослідження у водному лабіринті Морріса проводили для кожної групи на 11-й день після операції.

В даному дослідженні, щурів в кожній групі тренували один раз на день протягом 5 днів поспіль, тобто дослідження навігації місця. Час, необхідний тваринам, щоб знайти платформу (тобто, інкубаційний період виходу, в дослідженні у водному лабіринті Морріса) був зареєстрований. Тварин, які не змогли знайти платформу протягом приблизно 120 секунд, змушували пливти до платформи по прямій та стояти на платформі протягом 30 секунд, для індукування здатності до навчання та пам'ять. Після завершення дослідження навігації місця платформа була видаленою з інтервалом в 1 день. Щурів поміщали у воду з точки входу, та реєстрували час, коли вони вперше досягли вихідної платформи, та кількість разів, коли вони перетинали вихідну платформу, тобто дослідження простору за допомогою зонду. Здатність тварин до навчання та функція пам'яті були оцінені. Інкубаційний період виходу в дослідженні з водним лабіринтом Морріса, стосується часу, коли щур входить у воду, щоб знайти платформу. Чим коротшим є інкубаційний період виходу в дослідженні у водному лабіринті Морріса, тим кращою є пам'ять тварини.

Переваги представленого винаходу є додатково проілюстрованими у наступних необмежуваних прикладах. Проте, конкретні матеріали та їх кількості, та також інші умови дослідження, використані в прикладах, не повинні розглядатися як такі, що обмежують винахід. Якщо не зазначено інше, всі частини, пропорції, відсотки тощо в представленому винаході є розрахованими за масою.

Приклад 1:

Стадія 1): Отримання суміші олігосахаридів альгінової кислоти

5 кг альгінату натрію формулювали у розчин приблизно 10 %, та рН доводили приблизно до 3,0 шляхом додавання розведеної хлористоводневої кислоти. Розчин нагрівали до 80 °C та перемішували. Розчину давали прореагувати протягом 10 годин перед припиненням нагрівання. Після охолодження до кімнатної температури, рН доводили до 9,0, шляхом додавання NaOH, та потім доводили до 3,2, шляхом додавання розбавленої хлористоводневої кислоти. Розчин

центрифугували при 5000 об./хв... протягом 10 хв. Супернатант збирали та доводили до pH 1,0, шляхом додавання HCl. Після центрифугування, осад збирали, концентрували на роторному випарнику та сушили у вакуумі отримуючи 1500 г проміжної сполуки.

Дивись Фігуру 1 для ЯМР-спектра проміжної сполуки.

- 5 Спосіб вимірювання ЯМР є наступним: підготовка зразка: 30 мг зразка, що підлягає дослідженню, зважували, розчиняли у 0,5 мл D₂O та ліофілізували; для розчинення додатково додавали 0,5 мл дейтерованої важкої води; ліофілізація була проведена знову; та, на завершення, ліофілізований порошок зразка розчиняли у відповідній кількості важкої води, переносили у пробірку для ЯМР та готували розчин 100 мг/мл для дослідження; 0,01 % (мас./об.) дейтерованої натрієвої солі TSP (триметилсилілпропіонової) додавали як внутрішній стандарт. Збирання та обробка ядерно-магнітних даних: прилад для ядерного магнітного резонансу з перетворенням Фур'є 400М зібрав одновимірний спектр водню при 60 °C. Послідовність імпульсів становила 45° імпульсів, кожне отримання становило 4 секунди, час релаксації становив 1 секунду, та накопичення становило 20 разів, та ширина спектра становила від -2 ч./млн. до 10 ч./млн. Після збирання даних використовували перетворення Фур'є для отримання одновимірної спектра водню, та сигнал метильного водню TSP був встановлений на 0,00 ч./млн.

- 20 З Фігури 1 можна побачити, що проміжна сполука містить сегмент мануронової кислоти (M-блок, хімічний зсув 5,1 ч./млн.) та сегмент гулурунової кислоти (G-блок, хімічний зсув 5,5 ч./млн.), та також химерний сегмент мануронової кислоти та гулурунової кислоти (MG-блок, хімічний зсув 5,3 ч./млн.). 500 г проміжної сполуки зважували та розчиняли у дистильованій воді, для отримання розчину об'ємом 5 л. Розчин доводили до pH 6,5 за допомогою NaOH та нагрівали на водяній бані для регулювання температури реакції на рівні 75 °C. Швидкість потоку газу на виході з кисневого балона та потужність генератора озону були відрегульовані таким чином, щоб озон надходив у реакційний розчин при масовій концентрації потоку 8 г/год. Через 4 години реакції подачу озону припиняли та додавали відповідну кількість води, для доведення концентрації розчину приблизно до 10 %. Розчин фільтрували через ультрафільтраційну мембрану з відсіченням молекулярної маси 2000 Да для збирання ретентату. Зібрану рідину концентрували на роторному випарнику та сушили під вакуумом отримуючи 350 г продукту А.

- 30 Стадія 2): Аналіз співвідношень та структур олігосахаридів з різними ступенями полімеризації в олігосахариді альгінової дикислоти продукту А

- 100 мг вищезазначеного висушеного олігосахариду альгінової дикислоти продукту А точно зважували, розчиняли у воді до концентрації 10 мг/мл та пропускали через мембранний фільтр 0,22 мкм отримуючи розчин досліджуваного зразка. Співвідношення олігосахаридів з різним ступенем полімеризації в композиції визначали за допомогою молекулярно-ексклюзійної хроматографії Superdex peptide (GE Co.) в поєднанні з багатокутним лазерним світлорозсіюванням (MALS, Wyatt Co.). Умови експерименту були наступними:

Хроматографічна колонка: Superdex peptide 10/300G1

Рухома фаза: 0.1 моль/л NaCl

- 40 Об'єм вприскування: 10 мкл

Швидкість потоку: 0,3 мл/хв

Результати досліджень: від дисахариду до декасахариду були представлені dp2-dp10, відповідно, dp2 становив 18 %, dp3 становив 24 %, dp4 становив 23 %, dp5 становив 14 %, dp6 становив 8 %, dp7 становив 7 %, dp8 становив 2 %, dp9 становив 2 % та dp10 становив 2 %.

- 45 Стадія 3): PX-МС аналіз структур олігосахаридів з різним ступенем полімеризації в олігосахариді альгінової дикислоти продукту А

Умови експерименту:

Хроматографічна колонка: Superdex peptide 10/300G1

Рухома фаза: 20 % метанол + 80 % 80 ммоль/л NH₄Ac

- 50 Швидкість потоку: 0,1 мл/хв

Температура колонки: 25 °C ± 0,8 °C.

Умови мас-спектрометрії: Agilent 6540 QTOF; джерело іонів: напруга зіткнення ESI 120 В; режим негативного іону. Ширина отриманого сигналу (m/z) становила 100-1000.

- 55 Мас-спектри олігосахаридів з різними ступенями полімеризації наведені на Фігурах 1-3. Було проведено співвіднесення різних піків сигналів в мас-спектрах, що підтверджують молекулярні структури всіх олігосахаридів у продукті А, тобто структуру, показану у формулі (III). Співвіднесення сигналів та структур, відповідні сигналам, наведені у Таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Шість дикислотних структур олігосахаридів з різними ступенями полімеризації в продукті А та їх співвідношення маси до заряду у мас-спектрах

№	Молекулярна структура	Молекулярна формула	Співвідношення маси до заряду (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) _n 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) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₄ H ₆ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₄ H ₆ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₃ H ₄ O ₅ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

З наведеного вище мас-спектрометричного структурного аналізу було виявлено, що мануранову кислоту або гулуранову кислоту на відновлювальному кінці цукрового ланцюга в продукті А окиснюють до структури цукрової кислоти (дивіться загальну формулу IV для структури), яка може бути структурою мануранової кислоти або гулуранової кислоти, що включає 6 атомів вуглецю (m+m' = 3), з вмістом приблизно 10~30 %, або продуктом декарбоксилювання мануранової кислоти або гулуранової кислоти, тобто цукровою дикислотою, що містить 5 атомів вуглецю (m+m' = 2) (30~50 %) та цукровою дикислотою, що містить 4 атоми вуглецю (m+m' = 1) (30~40 %).

Стадія 4) ЯМР-аналіз вмісту гулуранової кислоти в олігосахариді альгінової дикислоти продукту А.

Приготування зразка: 50 мг досліджуваного зразка зважували, розчиняли в 0,5 мл D₂O та ліофілізували; для розчинення додавали 0,5 мл дейтерованої важкої води; знову була проведена ліофілізація; назавершення, ліофілізований порошок зразка розчиняли у відповідній кількості важкої води, все це переносили у пробірку для ЯМР та перетворювали в розчин 100 мг/мл для дослідження; та 0,01 % (мас./об.) дейтерованої натрієвої солі TSP (триметилсилілпропіонової) додавали як внутрішній стандарт.

Збір та обробка ядерно-магнітних даних: прилад для ядерного магнітного резонансу з перетворенням Фур'є 400М зібрав одновимірний спектр водню при кімнатній температурі.

Послідовність імпульсів становила 45° імпульсів, кожне отримання становило 4 секунди, час релаксації становив 1 секунду, та накопичення становило 20 разів, та ширина спектра становила від -2 ч./млн. до 10 ч./млн. Після збирання даних, для отримання одновимірного спектра водню застосовували перетворення Фур'є, та сигнал метильного водню TSP був встановлений на 0,00 ч./млн. Спектр протонного ядерного магнітного резонансу продукту А є наведеним на Фігурі 5. На Фігурі 5 мультіплет з хімічним зсувом 4,6 ч./млн. являє собою сигнал водню в положенні C-1 мануранової кислоти (M), 5,0 ч./млн. являє собою сигнал водню в положенні C-1 гулуранової кислоти (G), 4,9 ч./млн. являє собою сигнал водню C-1 химерного сегмента мануранової кислоти та гулуранової кислоти (MG).

Формула для розрахунку вмісту гулуранової кислоти являє собою:

$$G\% = \frac{I_{5.0} + 0.5I_{4.9}}{I_{5.0} + I_{4.6} + I_{4.9}} \times 100\%$$

У вищенаведеній Формулі І4.6, І5.0 та І4.9 відповідно являють собою інтегральні значення сигналу водню в положеннях С-1 мануринової кислоти (М), гулуринової кислоти (G), химерного сегменту мануринової кислоти та химерного сегменту гулуринової кислоти (MG). За розрахунком, вміст гулуринової кислоти у продукті А становить 30 %.

5 Приклад 2:

100 г комерційно доступного альгінату натрію (придбаного на веб-сайті Sinopharm Reagent Co., CAS № 9005-38-3, специфікація СР, досліджено в Шанхаї) зважували, рівномірно перемішували при додаванні дистильованої води та готували розчин з об'ємом 0,8 л після набухання. Розчин доводили до рН 4,0 за допомогою NaOH, та реакцію проводили при кінматній температурі (25 °С). Швидкість потоку газу на виході кисневого балона та потужність генератора озону були відрегульовані таким чином, щоб озон надходив у реакційний розчин при масовій концентрації швидкості потоку 1 г/год. Через 10 годин реакції подачу озону припиняли та додавали відповідну кількість води, для доведення концентрації розчину приблизно до 15 %. Розчин фільтрували через ультрафільтраційну мембрану з відсіченням молекулярної маси 1000 Да для збирання ретентату. Зібрану рідину концентрували на роторному випарнику та сушили під вакуумом отримуючи 80 г продукту В.

Співвідношення олігосахаридів з різними ступенями полімеризації у продукті В визначали за допомогою молекулярно-ексклюзійної хроматографії Superdex peptide (GE Co.) в поєднанні з багатокутним лазерним світлорозсіюванням (MALS, Wyatt Co.). Спосіб вимірювання був таким самим, як і відповідна частина у прикладі 1. Результати досліджень: від дисахариду до декасахариду були представлені dp2-dp10, відповідно, dp2 становив 25 %, dp3 становив 24 %, dp4 становив 18 %, dp5 становив 13 %, dp6 становив 10 %, dp7 становив 5 %, dp8 становив 2 %, dp9 становив 2 % та dp10 становив 1 %.

Вміст гулуринової кислоти в продукті В було визначено як 50 % при 60 °С із застосуванням приладу ядерного магнітного резонансу з перетворенням Фур'є 400М. Спосіб вимірювання був таким самим, як і у відповідній частині прикладу 1. Спектр протонного ядерного магнітного резонансу є наведеним на Фігурі 6. З фігури можна побачити, що інтегральна площа мануринової кислоти (М, значення хімічного зсуву 4,6 ч./млн.) та гулуринової кислоти (G, значення хімічного зсуву 5,0 ч./млн.) є відносно близькими, в той час як інтегральна площа химерного сегмента мануринової кислоти та гулуринової кислота (MG, хімічний зсув 4,9 ч./млн.) є малою. Відповідно до формули для розрахунку вмісту гулуринової кислоти в продукті (G), вміст G становить 50 %.

Приклад 3:

Зважували 100 г проміжної сполуки з прикладу 1. Після додавання води для суспендування, додавали NaOH, для доведення значення рН до основного, щоб забезпечити повне розчинення порошку. В кінцевому підсумку розчин був приготований у вигляді розчину об'ємом 1 л, та додатково була додана HCl, для доведення значення рН до 2,95. Частина білих осадів, що з'явилася, була видалена шляхом центрифугування. Супернатант був зібраний. Для додаткового розведення додавали дистильовану воду отримуючи розчин об'ємом 1,5 л. РН розчину доводили до 9,0 за допомогою NaOH, та реакцію проводили на водяній бані при 45 °С. Швидкість потоку газу на виході кисневого балона та потужність генератора озону були відрегульовані таким чином, щоб озон надходив у реакційний розчин при масовій концентрації швидкості потоку 3 г/год. Через 2 години реакції, подачу озону припиняли, та додавали відповідну кількість води, для доведення концентрації розчину приблизно до 5 %. Розчин фільтрували через ультрафільтраційну мембрану з відсіченням молекулярної маси 3000 Да для збирання ретентату. Зібрану рідину концентрували на роторному випарнику та сушили під вакуумом отримуючи 60 г продукту С.

Співвідношення олігосахаридів з різними ступенями полімеризації у продукті С визначали за допомогою молекулярно-ексклюзійної хроматографії Superdex peptide (GE Co.) в поєднанні з багатокутним лазерним

світлорозсіюванням (MALS, Wyatt Co.). Спосіб вимірювання був таким самим, як і відповідна частина у прикладі 1. Результати досліджень: від дисахариду до декасахариду були представлені dp2-dp10, відповідно, dp2 становив 9 %, dp3 становив 21 %, dp4 становив 27 %, dp5 становив 18 %, dp6 становив 13 %, dp7 становив 6 %, dp8 становив 3 %, dp9 становив 2 % та dp10 становив 1 %.

Вміст гулуринової кислоти в продукті С було визначено як 10 % із застосуванням приладу ядерного магнітного резонансу з перетворенням Фур'є 400М при 60 °С, та спосіб визначення був таким самим, як і у відповідній частині прикладу 1. Результати дослідження є наведеним на Фігурі 7. При розділеному інтегруванні відповідних сигналів, інтегральна площа мануринової кислоти (М, значення хімічного зсуву 4,6 ч./млн.) в 13 разів є більшою за інтегральну площу

гулурунової кислоти (G, значення хімічного зсуву 5,0 ч./млн.), в той час як інтегральна площа химерного сегмента манурунової кислоти та гулурунової кислота (MG, хімічний зсув 4,9 ч./млн.) є близькою до площі гулурунової кислоти. Відповідно до формули для розрахунку вмісту гулурунової кислоти в продукті (G), наведеної в прикладі 1, вміст G становить 10 %.

5 Приклад 4:

Оцінка фармакологічної активності композиції олігосахариду альгінової дикислоти та гексасахариду манурунової дикислоти.

Підготовка зразка:

1. Отримання гексасахариду манурунової дикислоти

10 3 посиланням на способи, розкриті в прикладах 1 та 2 патенту 200580009396.5 з попереднього рівня техніки, отримували 20 г гексасахариду манурунової дикислоти.

Співвідношення олігосахаридів та вмісту гулурунової кислоти в продуктах А, В та С, отриманих в попередніх прикладах 1, 2 та 3 представленої заявки, наведені у таблиці 2 нижче.

2. Отримання продукту D

15 Продукт з високим вмістом G отримували з посиланням на спосіб отримання прикладу 2 вище. Вихідним матеріалом для альгінату натрію був зразок з високим вмістом G, наданий Qingdao Haizhilin Biotechnology Development Co., Ltd., та спосіб отримання був таким самим, як і у відповідній частині прикладу 2. Зокрема, 500 г порошку альгінату натрію з високим вмістом G було рівномірно змішано з дистильованою водою та приготовано розчин об'ємом 5 л після
20 набрякання, та потім доведено до pH 4,0 за допомогою NaOH, та розчин прореагував при кімнатній температурі 25 °C. Швидкість потоку газу на виході кисневого балона та потужність генератора озону були відрегульовані таким чином, щоб озон надходив у реакційний розчин при масовій концентрації швидкістю потоку 1 г/год. Через 12 годин реакції, подачу озону припиняли, та додавали відповідну кількість води, для доведення концентрації розчину приблизно до 15 %.
25 Розчин фільтрували через ультрафільтраційну мембрану з відсіченням молекулярної маси 3,000 Да для збирання ретентату. Зібрану рідину концентрували на роторному випарнику та сушили під вакуумом отримуючи 350 г продукту D.

Співвідношення олігосахаридних компонентів з різними ступенями полімеризації у продукті D визначали за допомогою молекулярно-ексклюзійної хроматографії Superdex peptide (GE Co.)
30 в поєднанні з багатокутовим лазерним світлорозсіюванням (MALS, Wyatt Co.). Спосіб вимірювання був таким самим, як і відповідна частина у прикладі 1. Результати досліджень: від дисахариду до декасахариду були представлені dp2-dp10, відповідно, dp2 становив 18 %, dp3 становив 26 %, dp4 становив 20 %, dp5 становив 15 %, dp6 становив 8 %, dp7 становив 7 %, dp8 становив 3 %, dp9 становив 2 % та dp10 становив 1 %.

35 Вміст гулурунової кислоти в продукті С було визначено як 60 % при 60 °C із застосуванням приладу ядерного магнітного резонансу з перетворенням Фур'є 400М. Спосіб вимірювання був таким самим, як і у відповідній частині прикладу 1. Спектр ядерного магнітного резонансу водню є наведеним на фігурі 8. З фігури можна побачити, інтегрована площа гулурунової кислоти (G, значення хімічного зсуву 5,0 ч./млн.) є більшою, ніж у манурунової кислоти (M, значення
40 хімічного зсуву 4,6 ч./млн.), в той час як інтегральна площа химерного сегмента манурунової кислоти та гулурунової кислоти (MG, хімічний зсув 4,9 ч./млн.) є меншою. Відповідно до формули для розрахунку вмісту гулурунової кислоти в продукті (G), в прикладі 1, вміст G становить 60 %.

Таблиця 2

Відсотковий вміст олігосахаридів та вміст гулурунової кислоти в продуктах олігосахаридної композиції альгінової дикислоти

Співвідно- шення Композиція	Диса- харид	Три- сахарид	Тетра- сахарид	Пента- сахарид	Гек- сасахарид	Гепта- сахарид	Окта- сахарид	Нона- сахарид	Дека- сахарид	Вміст гулу- руно- вої кис- лоти
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 %

45

Відбирали по 10 г кожного з чотирьох вищезазначених зразків А, В, С та D та зразок

гексасахариду мануронової кислоти. Відповідно до способів, описаних в "тваринній моделі для фармакодинамічної оцінки проти-AD", "тваринній моделі для фармакодинамічної оцінки проти-PD", "тваринній моделі для фармакодинамічної оцінки протизапальної реакції", "тваринній моделі для фармакодинамічної оцінки проти цукрового діабету", "тваринній моделі для фармакодинамічної оцінки знеболювання" та "тваринній моделі для фармакодинамічної оцінки проти судинної деменції", фармакологічні активності зазначених олігосахаридних композицій альгінової дикислоти порівнювали з фармакологічною активністю гексасахариду мануронової дикислоти.

1. Фармакодинамічна оцінка ефективності проти-AD

У дослідженні, в порівнянні з контрольною групою імітації операції, модельна група мала значно більш тривалий інкубаційний період для пошуку платформи, що вказує на те, що оцінки моделі була успішно досягнута. Порівняно з модельною групою, інкубаційний період для пошуку платформи в кожній групі дозування був значно коротшим.

Після того, як дослідження навігації місця було завершеним, був один день відпочинку. Платформу було вилучено та розпочато дослідження простору за допомогою зонду. Спостерігали та визначали кількість разів, коли тварини перетинали платформу, та відсоток дистанції плавання в квадраті, де була розташована платформа, від загальної відстані. Здатність до навчання і функція пам'яті тварин були оцінені. Результати показали, що в порівнянні з контрольною групою імітації операції, кількість разів перетину платформи в модельній групі була значно зменшеною, та кількість разів перетину платформи в групі дозування була значно збільшеною, як показано на фігурі 9. Відсоток дистанції плавання в квадранті, де вихідна платформа перебувала на загальній дистанції, мав аналогічну тенденцію кількості разів перетину платформи. Порівняно з контрольною групою імітації операції, відсоток дистанції плавання в квадранті, де вихідна платформа була розташована на загальній дистанції, в модельній групі був значно знижений, та відсоток дистанції плавання в квадранті, де вихідна платформа була розташована на загальній відстані, значно збільшився в групі дозування, як показано на фігурі 10.

Результати досліджень показали, що фармакодинамічні активності продуктів А, В та С були сильнішими, ніж у гексасахариду мануронової дикислоти, що вказує на те, що олігосахаридна композиція, що містить певну кількість гулурунової кислоти та має співвідношення дисахаридів до гексасахаридів більше ніж 60 % має синергетичний ефект. Проте, активність олігосахаридної композиції D з більш високим вмістом гулурунової кислоти знижувалася.

2. Фармакодинамічна оцінка ефективності проти-PD

У дослідженні, порівняно з порожньою контрольною групою, інкубаційний період та час спуску модельної групи були значно довшими. Порівняно з модельною групою, інкубаційний період та час спуску для кожної групи дозування були скорочені в різному ступені. Серед них фармакодинамічні активності продуктів А, В і С були кращими, ніж у гексасахариду мануронової дикислоти з єдиним ступенем полімеризації, який, як передбачалося раніше, був найбільш активним. Але активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануронової дикислоти. Не прив'язуючись до будь-якої теорії, передбачається, що вміст гулурунової кислоти в композиції та співвідношення дисахариду до гексасахариду мають значний вплив на активність продукту, проте, коли частка гулурунової кислоти є занадто високою, активність композиції знизиться. Дивись фігури 11 та 12.

3. Фармакодинамічна оцінка ефективності протизапальної реакції

(1) Мишача модель артриту індукованого колагеном

У дослідженні, порівняно з нормальною контрольною групою, модельна група продемонструвала очевидні симптоми артриту, та також помірну еритему та набряк суглобів гомілковостопних суглобів, променезап'ясткових суглобів та плеснових кісток. Клінічна оцінка досягла 6 балів, що означає, що модель артриту була успішно досягнута. Порівняно з модельною групою, захворюваність в кожній групі дозування була зниженою в різному ступені. Продукти А, В та С значно уповільнювали час до початку реакції у мишей порівняно з гексасахаридом мануронової дикислоти з одним ступенем полімеризації, та клінічна оцінка також була нижчою порівняно з гексасахаридом мануронової дикислоти, що вказує на те, що фармакодинамічні активності продуктів А, В та С були кращими, ніж фармакодинамічна активність гексасахариду мануронової дикислоти. Але дія продукту D починалася раніше, та клінічна оцінка була вищою, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануронової дикислоти. Зазначене демонструє, що вміст гулурунової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулурунової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується.

(2) Мишача модель розсіяного склерозу індукованого MOG

В дослідженні, порівняно з нормальною контрольною групою у більшості мишей в модельній групі спостерігалися слабкість та параліч обох задніх кінцівок. Середня клінічна оцінка модельної групи досягла 3 балів, що свідчить про те, що модель розсіяного склерозу була успішно досягнута. Порівняно з модельною групою, прогресування запалення в кожній групі дозування було знижено в різному ступені. Клінічні показники продуктів А, В та С протягом всього експерименту та в кінцевій точці були нижчими, ніж у гексасахариді мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакодинамічні активності продуктів А, В та С були кращими, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти; в той час як клінічна оцінка продукту D протягом всього експерименту та в кінцевій точці була трохи вищою, що вказує на те, що протизапальна активність препарату D була найслабшою. Зазначене демонструє, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується.

(3) Мишача модель MRL/lpr системного червоного вовчака

Починаючи з 10 тижня, у трансгенних мишей почало розвиватися захворювання, та спостерігалось набухання лімфатичних вузлів, та оцінка лімфатичних вузлів продовжувала збільшуватися з плином часу, що вказує на те, що в модельній групі, захворювання успішно розвинулося та захворювання швидко прогресувало. Порівняно з модельною групою, прогресування захворювання у всіх групах дозування було знижено в різному ступені. Продукти А, В та С значно уповільнювали час початку реакції у мишей порівняно з гексасахаридом мануринової дикислоти, та оцінка лімфатичних вузлів була також нижчою, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакодинамічні активності продуктів А, В та С були кращими, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, час початку реакції продукту D був раніше, та його оцінка лімфатичних вузлів була вищою, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Зазначене демонструє, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується.

(4) Мишача модель коліту, індукованого декстрансульфатом натрію (DSS)

Після завершення дослідження, порівняно з нормальною контрольною групою, товста кишка в модельній групі була значно вкороченою через запалення, та більшість мишей втратили вагу. Майже половина тварин в модельній групі померла пізніше, що вказує на дуже серйозне запалення кишківника. Порівняно з модельною групою, запалення кишківника в кожній групі дозування, було знижено до різного ступеня, що знаходило відображення у відновленні довжини товстої кишки та покращенні рівня виживаності. З фігур 13a та 13b можна було бачити, що продукти А, В та С робили довжину товстої кишки та виживаність тварин більшою, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакодинамічні активності продуктів А, В та С були більш кращими, ніж фармакодинамічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте продукт D мав меншу довжину ободової кишки та трохи нижчу виживаність порівняно з гексасахаридом мануринової дикислоти, що відображає більш слабку активність продукту D, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Аналогічним чином, результати досліджень відповідали результатам попередніх досліджень, демонструючи те, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується.

4. Фармакодинамічна оцінка ефективності проти цукрового діабету

В дослідженні, модельна група була порівняною з нормальною контрольною групою, та рівень глюкози в крові після прийому їжі модельної групи був значно вищим, що вказує на те, що оцінка моделі була успішно досягнута. Порівняно з модельною групою, рівень глюкози в крові після прийому їжі кожної групи дозування був значно нижчим. Серед них, фармакодинамічні активності продуктів А, В та С були кращими, ніж фармакодинамічна активність гексасахариду мануринової дикислоти, але активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Результати досліджень відповідали результатам попередніх досліджень, вказуючи на те, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується. Дивись фігуру 14.

5. Фармакодинамічна оцінка ефективності знеболювання

(1) Мишача модель болю індукованого оцтовою кислотою

В дослідженні, порівняно з порожньою контрольною групою, інкубаційний період корчів в модельній групі був значно коротшим, та кількість корчів значно збільшилася, що вказує на те, що оцінка моделі була успішно досягнута. Порівняно з модельною групою, інкубаційний період корчів в кожній групі дозування, був значно продовжений, та кількість разів корчів була значно меншою. Серед них, продукти А, В та С дозволяли інкубаційному періоду корчів у мишей бути довшим, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, та дозволяли кількості разів корчів бути меншою, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що на фармакодинамічні активності продуктів А, В та С були кращими, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав більш короткий інкубаційний період корчів та трохи більшу кількість разів корчів в порівнянні з гексасахаридом мануринової дикислоти, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Аналогічним чином результати досліджень відповідали результатам попередніх досліджень, показуючи, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується. Дивись фігури 15 та 16.

(2) Щурача модель мігрени індукованої нітрогліцерином

Приблизно через 3 хвилини після підшкірної ін'єкції нітрогліцерину, у щурів з'явилося почервоніння вух, яке тривало приблизно 2,5 години. Кількість подряпин на голові протягом 30-45 хвилин після моделювання в модельній групі було значно більшою, ніж у порожній контрольній групі. Порівняно з модельною групою, група дозування показала значну затримку появи почервоніння вух, скорочення тривалості почервоніння вух та зменшення кількості подряпин на голові протягом 30-45 хвилин. Серед них, продукти А, В та С дозволяли знизити кількість подряпин на голові у щурів у порівнянні з гексасахаридом мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакологічні активності продуктів А, В, С та D були кращими, ніж фармакологічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав у кілька разів більше подряпин на голові у мишей в порівнянні з гексасахаридом мануринової дикислоти, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Аналогічним чином, результати досліджень відповідали результатам попередніх досліджень, показуючи, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується. Дивись фігуру 17.

(3) Модель мігрени, індукована електростимуляцією ганглію трійчастого нерва

Електрична стимуляція ганглію трійчастого нерва щура, очевидно, викликала ексудацію сироваткового білка твердої мозкової оболонки. У порівнянні з порожньою контрольною групою та групою імітації операції, рівень PPE був значно збільшений, та кількість клітин з позитивною експресією c-fos була значно збільшеною в модельній групі. У порівнянні з модельною групою, рівень PPE був значно знижений, та кількість клітин з позитивною експресією c-fos була значно зменшеною в групі дозування. Серед них, кількість клітин з позитивною експресією c-fos в продуктах А, В та С була меншою, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакологічні активності продуктів А, В, С та D були кращими, ніж фармакологічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав трохи більшу кількість клітин з позитивною експресією c-fos в порівнянні з гексасахаридом мануринової дикислоти, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Аналогічним чином, результати дослідження відповідали результатам попередніх досліджень, показуючи, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується. Дивись фігуру 18.

6. Фармакодинамічна оцінка ефективності проти судинної деменції

(1) Мишача модель судинної деменції, індукованої двосторонньою оклюзією загальної сонної артерії (БССАо)

1.1 Результати дослідження на уникнення темряви

Під час дослідження модельна група була порівняною з контрольною групою імітації операції. Для модельної групи, інкубаційний період в дослідженні на уникнення темряви був значно коротшим, та кількість помилок була значно збільшеною, що вказує на те, що здатність до запам'ятовування у мишей в модельній групі була значно зниженою, та оцінка моделі була успішно досягнута. У порівнянні з модельною групою, інкубаційний період в дослідженні на уникнення темряви в кожній групі дозування був значно збільшеним, та кількість помилок була значно зменшеною. Серед них, інкубаційні періоди у мишей в групах продуктів А, В та С були довшими, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакологічні

активності продуктів А, В, С та D були кращими, ніж фармакологічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав трохи коротший інкубаційний період у мишей, порівняно з гексасахаридом мануринової дикислоти, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Аналогічним чином, результати досліджень відповідали результатам попередніх досліджень, показуючи, що вміст гулуринової кислоти та співвідношення дисахариду до гексасахариду в композиції мають значний вплив на активність продукту. Проте, коли вміст гулуринової кислоти є занадто великим, активність композиції знижується. Дивись фігури 19 та 20.

1.2 Результати дослідження у водному лабіринті Морріса

В дослідженні, в порівнянні з групою імітації операції, інкубаційний період виходу в дослідженні у водному лабіринті Морріса у мишей в модельній групі був значно довшим, що вказує на те, що мишача модель судинної деменції, індукованої ВССАО, була успішно досягнута. У порівнянні з модельною групою, інкубаційний період виходу для кожної групи дозування був значно коротшим. Серед них, інкубаційні періоди у мишей в групах продуктів А, В та С були коротшими, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакологічна активність продуктів А, В, С та D була кращою, ніж фармакологічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав трохи більш тривалий інкубаційний період порівняно з гексасахаридом мануринової дикислоти, що відображає більш слабку активність продукту D, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Дивись фігуру 21.

Через чотири дні після дослідження навігації водного лабіринту платформу видаляли. Дослідження простору за допомогою зонду проводилося для спостереження за кількістю разів, коли тварини перетинали платформу. У порівнянні з групою імітації операції кількість разів, коли миші перетинали вихідну платформу в модельній групі, було значно зменшено, що вказує на те, що здатність до запам'ятовування у мишей з ВССАО була значно зниженою; в той час як кількість разів, коли миші перетинали вихідну платформу в кожній групі дозування, збільшувалася. Серед них, кількість разів, коли миші перетинали платформу в групах продуктів А, В та С, була вищою, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакологічні активності продуктів А, В, С та D були кращими ніж фармакологічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав дещо меншу кількість разів, коли миші перетинали платформу, в порівнянні з гексасахаридом мануринової дикислоти, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти. Дивись фігуру 22.

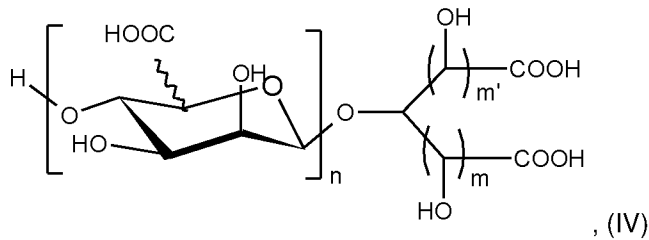
(2) Ефект у щурів з судинною деменцією, викликаною оклюзією середньої мозкової артерії (МСАО)

У дослідженні, в порівнянні з групою імітації операції, інкубаційний період виходу в дослідженні у водному лабіринті Морріса у щурів в модельній групі, був значно довшим, що вказує на те, що модель судинної деменції мишей, індукованої МСАО, була успішно досягнута. У порівнянні з модельною групою, інкубаційний період виходу для кожної групи дозування був значно коротшим. Серед них, інкубаційні періоди виходу щурів в продуктах А, В та С були коротшими, ніж у гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакодинамічні активності продуктів А, В, С та D були кращими, ніж фармакодинамічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав трохи більш тривалий інкубаційний період виходу порівняно з гексасахаридом мануринової дикислоти, що відображає більш слабку активність продукту D, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти.

Через день після завершення дослідження навігації місця було проведено дослідження простору за допомогою зонду для спостереження та визначення кількості разів, коли тварина перетинала платформу протягом 2 хвилин. У порівнянні з групою імітації операції, кількість разів, коли щури перетинали вихідну платформу, була значно зменшеною в модельній групі, що вказує на те, що здатність до запам'ятовування у щурів в групі з МСАО була значно зниженою; в той час, як кількість разів, коли щури перетинали вихідну платформу в кожній групі дозування, була збільшеною. Серед них, кількість разів, коли щури перетинали платформу в продуктах А, В та С, була вищою, ніж в гексасахариду мануринової дикислоти, що вказує на те, що фармакологічні активності продуктів А, В, С та D були кращими, ніж фармакологічна активність гексасахариду мануринової дикислоти. Проте, продукт D мав трохи меншу кількість разів, коли щури перетинали платформу, порівняно з гексасахаридом мануринової дикислоти, що свідчить про те, що активність продукту D була слабшою, ніж активність гексасахариду мануринової дикислоти.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти, що містить мануранову кислоту формули (IV) та гулуранову кислоту або її фармацевтично прийнятну сіль:



де n являє собою ціле число, вибране з від 1 до 9, m є вибраним з 0, 1 або 2, m' є вибраним з 0 або 1, та

де загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-5$, становить не менше ніж 60 % від загальної маси композиції; та

де загальна маса гулуранових кислот становить 0,1-50 % від загальної маси композиції; та

де загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, в яких $m+m'=1$ та 2, становить не менше ніж 50 % від загальної маси композиції.

2. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 1, в якій загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $m+m'=1$ та 2, становить переважно від 60 до 90 %, більш переважно від 70 до 90 %.

3. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 2, в якій загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $m+m'=1$, становить не менше ніж 10 % від загальної маси композиції, переважно від 30 до 40 %.

4. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 1, в якій загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $m+m'=2$, становить не менше ніж 10 % від загальної маси композиції, переважно від 30 до 50 %.

5. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 1, в якій загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-5$, становить від 80 до 95 % від загальної маси композиції.

6. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 1, в якій загальна маса олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-3$, становить від 20 до 70 % від загальної маси композиції.

7. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 1, в якій співвідношення загальної маси олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-3$, до загальної маси олігосахариду альгінових дикислот, де $n=4-7$, становить від 1,0 до 3,5.

8. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 7, в якій співвідношення загальної маси олігосахариду альгінових дикислот, де $n=1-3$, до загальної маси олігосахариду альгінових дикислот, де $n=4-7$, становить від 1,0 до 3,0.

9. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 1, в якій загальна маса гулуранової кислоти становить переважно від 1 до 30 % від загальної маси композиції.

10. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за будь-яким одним з пп. 1-9, в якій масовий відсотковий вміст олігосахариду альгінових дикислот в композиції з кожним зі ступенів полімеризації складає: дисахарид від 5 до 25 %, трисахарид від 15 до 30 %, тетрасахарид від 15 до 28 %, пентасахарид від 10 до 25 %, гексасахарид від 5 до 15 %, гепсасахарид від 3 до 10 %, октасахарид від 2 до 5 %, нонасахарид від 1 до 5 %, декасахарид від 1 до 5 %.

11. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за п. 10, в якій масовий відсотковий вміст олігосахариду альгінових дикислот в композиції з кожним зі ступенів полімеризації складає: дисахарид від 10 до 20 %, трисахарид від 18 до 30 %, тетрасахарид від 15 до 28 %, пентасахарид від 15 до 20 %, гексасахарид від 5 до 10 %, гепсасахарид від 3 до 5 %, октасахарид від 2 до 3 %, нонасахарид від 1 до 3 %, декасахарид від 1 до 3 %.

12. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за будь-яким одним з пп. 1-11, в якій фармацевтично прийнятна сіль являє собою натрієву сіль або калієву сіль.

13. Продукт медичного призначення, що містить ефективну кількість композиції олігосахариду альгінової дикислоти за будь-яким одним з пп. 1-12 та прийнятний носій, за потреби.

14. Застосування композиції олігосахариду альгінової дикислоти за будь-яким одним з пп. 1-12 у виробництві лікарського засобу або продукту медичного призначення для лікування хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, запалення, болю, цукрового діабету або судинної деменції.

15. Композиція олігосахариду альгінової дикислоти за будь-яким одним з пп. 1-12, яка застосовується як лікарський засіб або продукт медичного призначення для лікування хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, запалення, болю, цукрового діабету або судинної деменції.

16. Спосіб лікування пацієнта, який страждає на хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, запалення, біль, цукровий діабет або судинну деменцію, що включає введення ефективної кількості композиції олігосахариду альгінової дикислоти за будь-яким одним з пп. 1-12 пацієнту, який цього потребує.

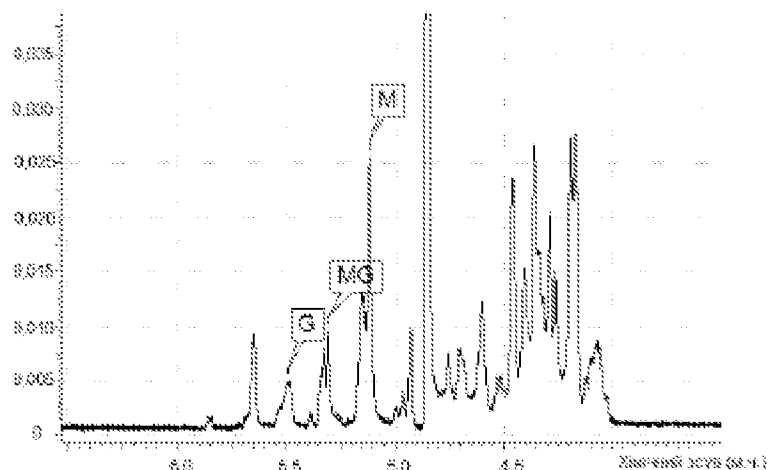


Fig. 1

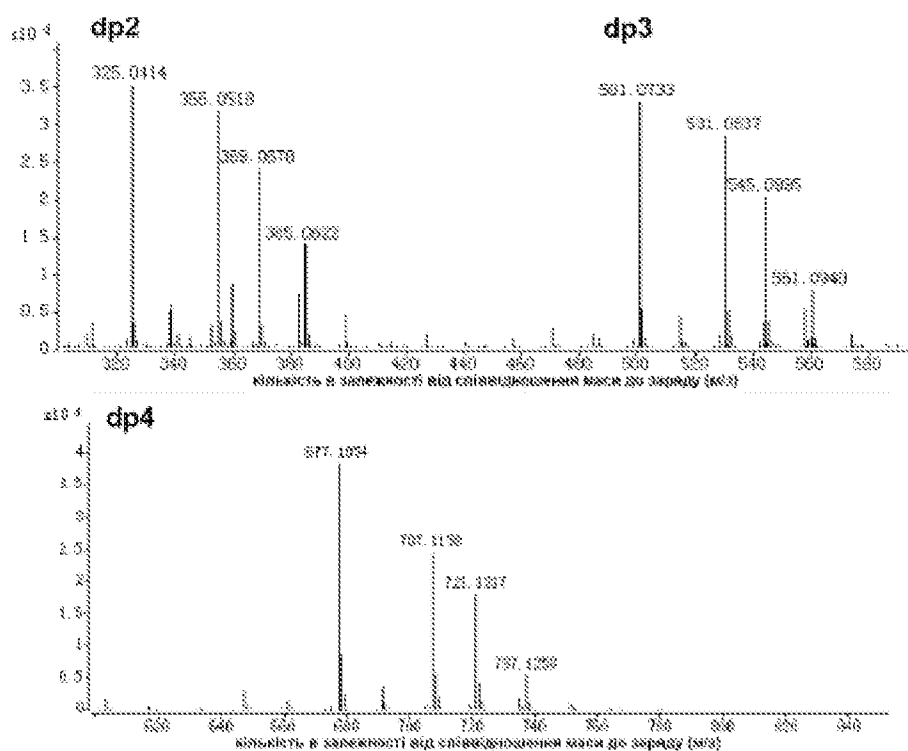


Fig. 2

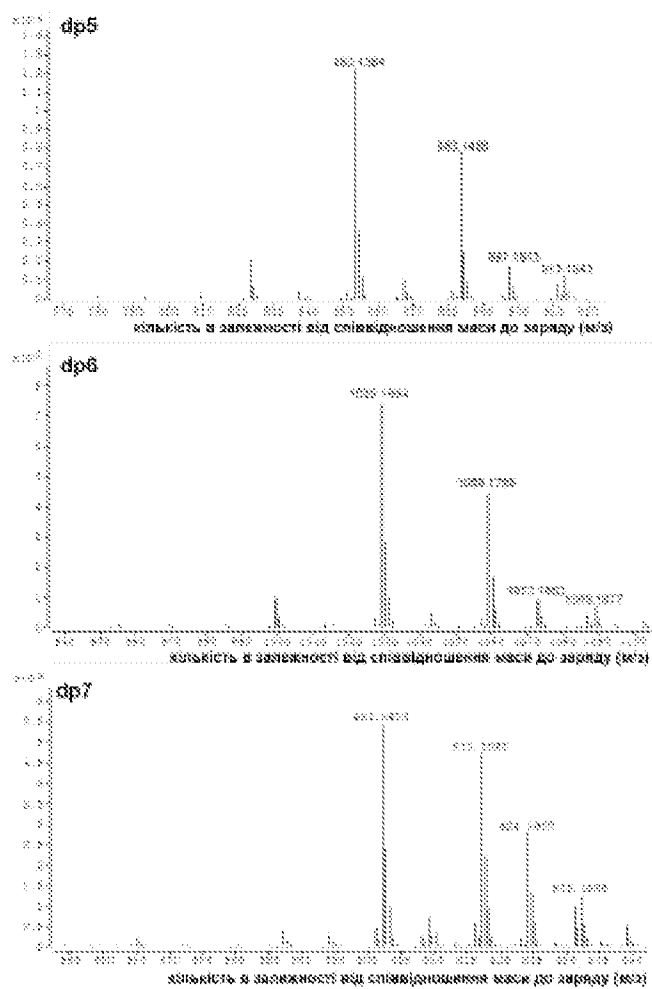
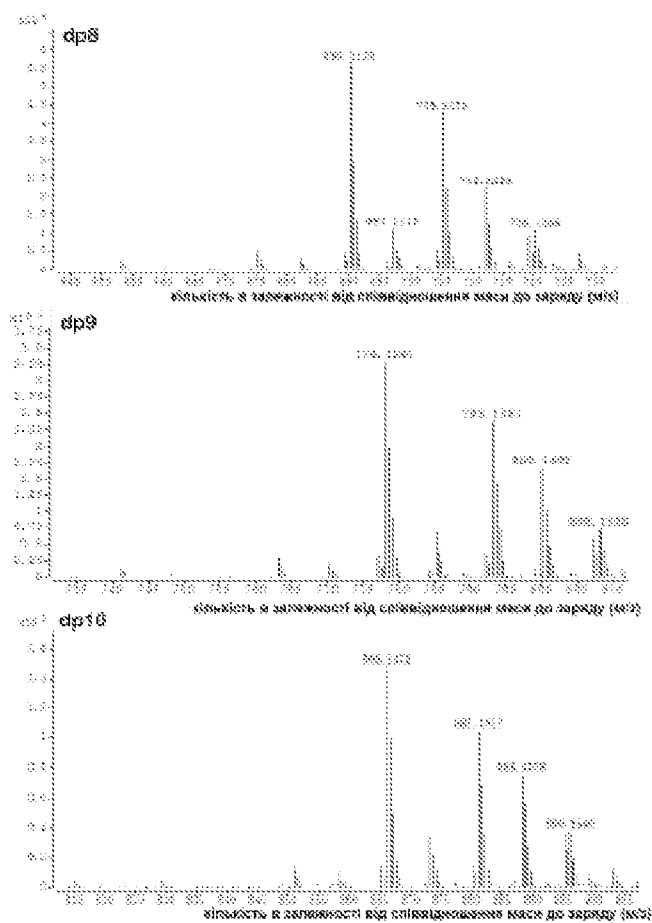
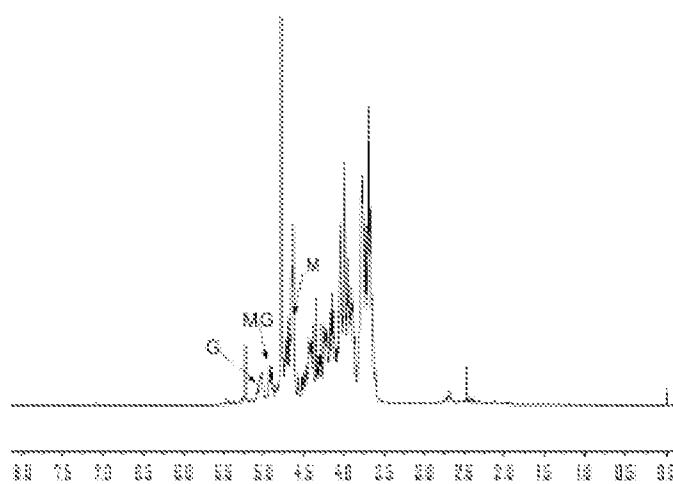


Fig. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

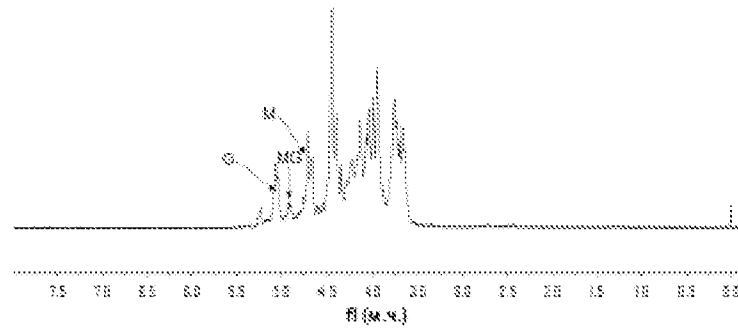


Fig. 6

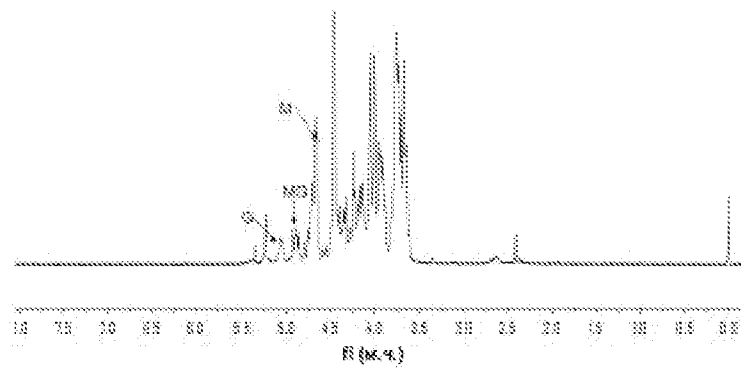


Fig. 7

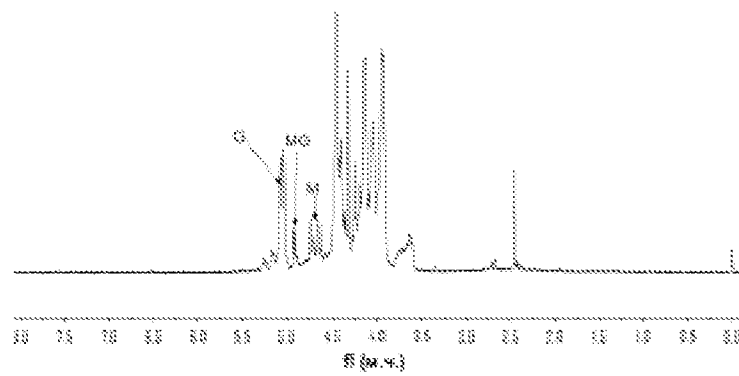


Fig. 8

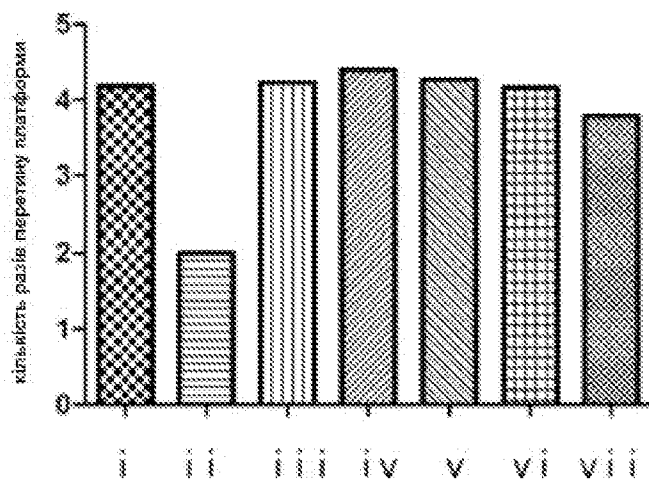


Fig. 9

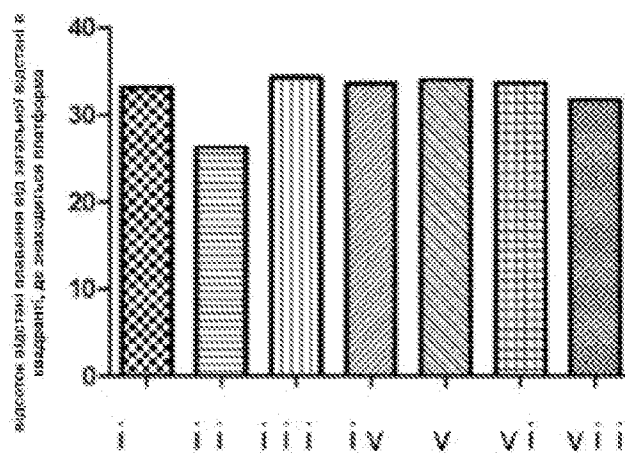


Fig. 10

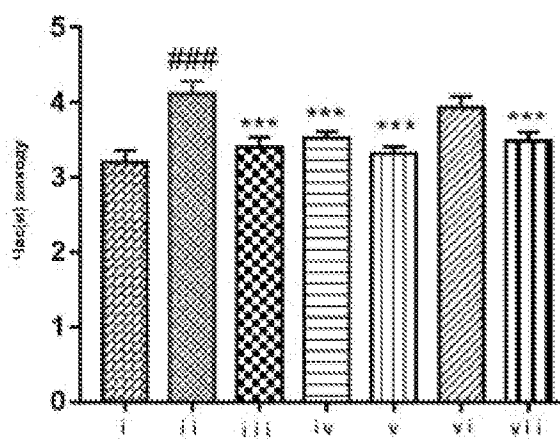
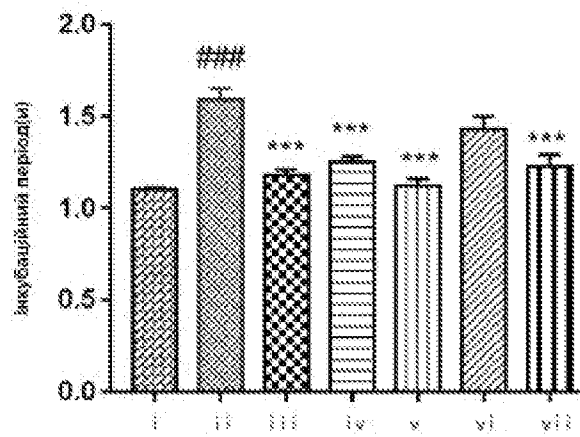
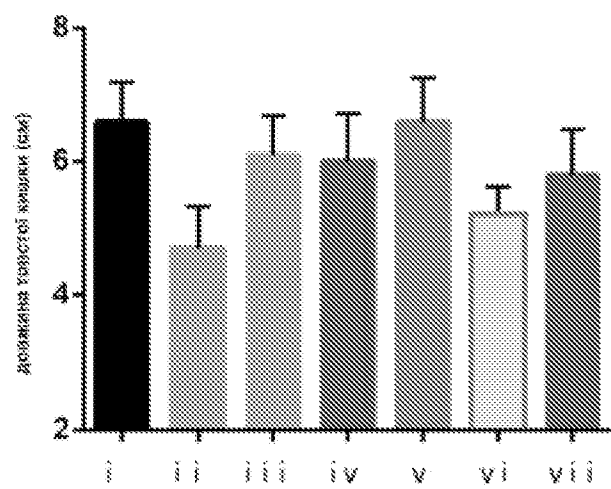


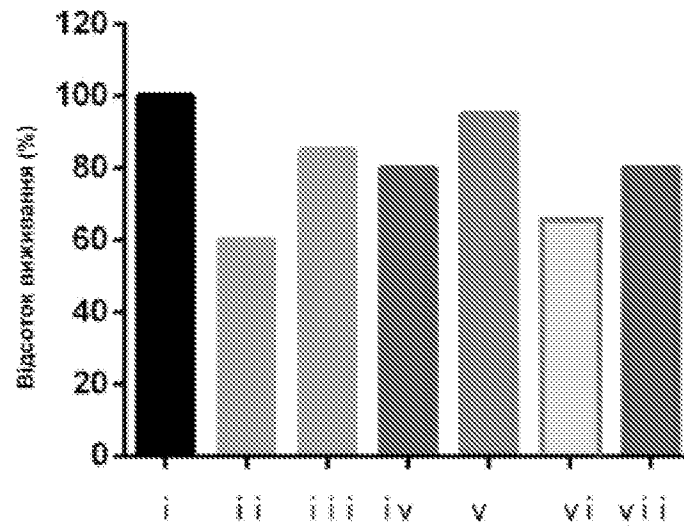
Fig. 11



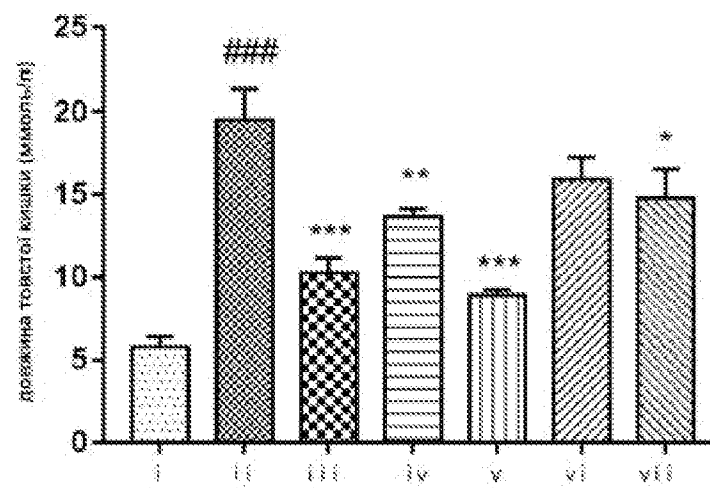
Фиг. 12



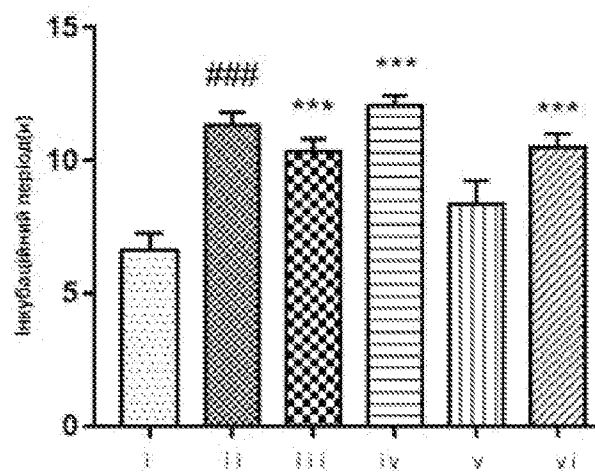
Фиг. 13a



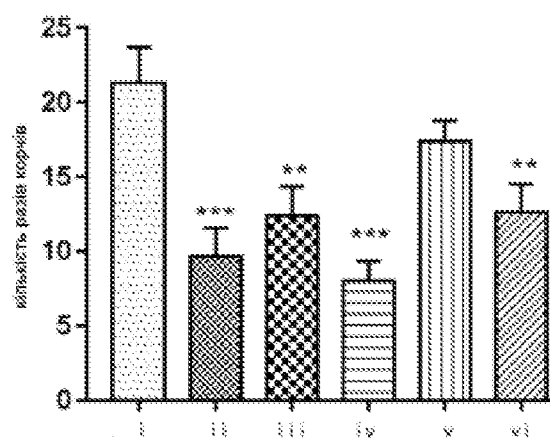
Фіг. 13b



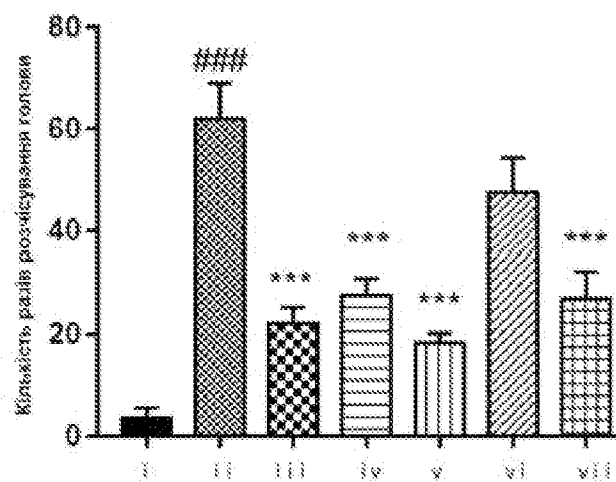
Фіг. 14



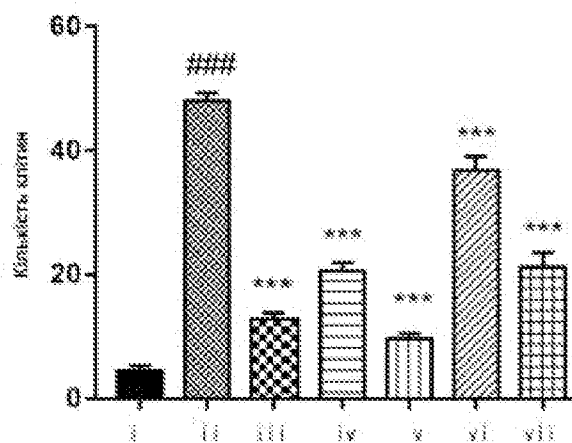
Фіг. 15



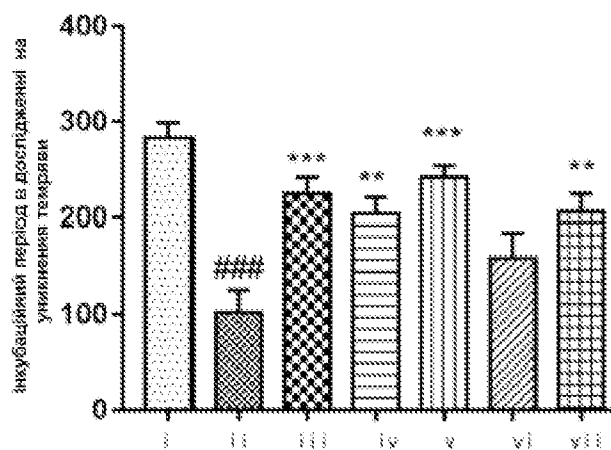
Фіг. 16



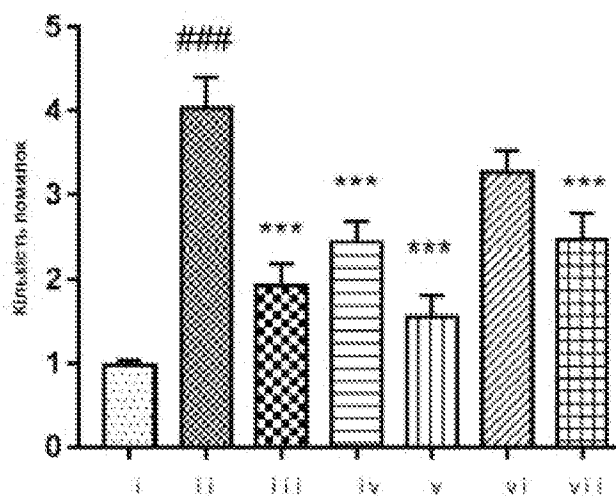
Фіг. 17



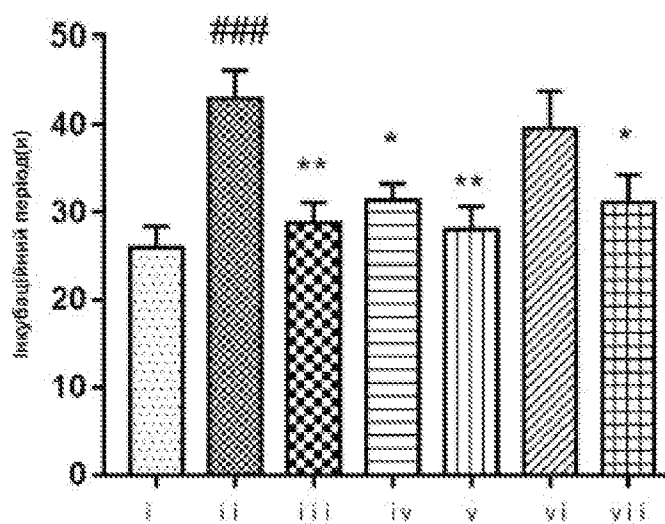
Фіг. 18



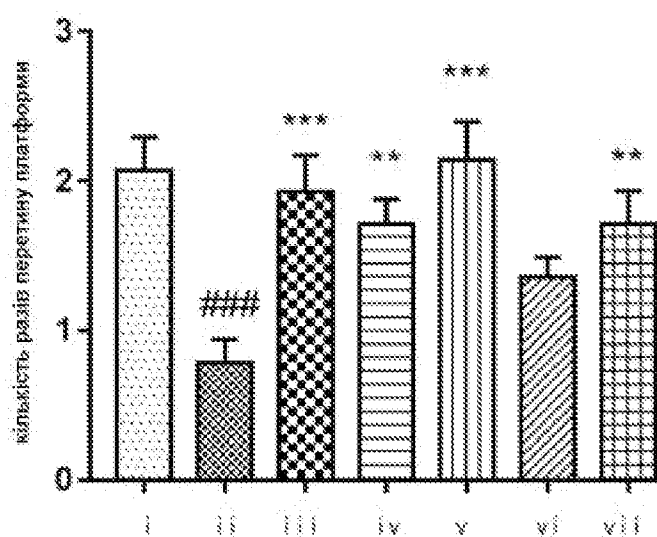
Фіг. 19



Фіг. 20



Фіг. 21



Фіг. 22