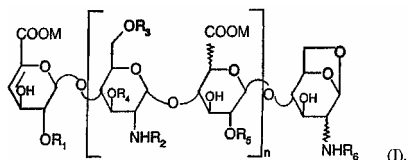


Дійсний винахід відноситься до олігасахариди формули:



їхніх сумішей, їх діастереоізомерів, способу їх одержання й олігасахаридвмісних фармацевтичних композицій.

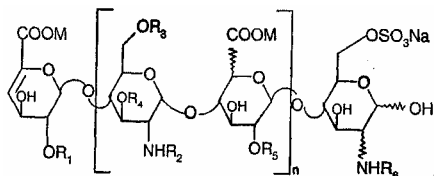
Дисахариди-сульфати, що мають на відновлюючому кінці структуру 1,6-ангідро, були описані H.P.Wessel, J.Carbohydrate chemistry, 1(8), 1039-1052 (1992). Ні про яку їхню фармакологічну активність не згадувалося.

У патенті EP 84999 і авторами Y.Ichikawa із співроб., Carbohydr. Res., 141, 273-282 (1985), були також описані трисахариди-сульфати з ланкою 1,6-ангідро як проміжні продукти для одержання вищих олігасахариди. Ці трисахариди мають слабку активність анти-Ха.

У формулі I є цілим числом від 0 до 25; R₁, R₃, R₄ і R₅, однакові чи різні, означають атом чи водню радикал SO₃M; R₁ і R₆, однакові чи різні, означають атом водню чи радикал SO₃M чи COCH₃; і M означає натрій, кальцій, магній чи калій. Ці олігасахариди містять, таким чином, парне число сахаридів.

R₄ у формулі I є переважно атомом водню, а n переважно є цілим числом від 0 до 10, переважно від 0 до 6 і ще більш переважно від 1 до 6.

Олігасахариди формули I можуть бути отримані дією гідроксиду лужного металу чи четвертинного амонію на олігасахариди формули:



у якій n є цілим числом від 0 до 25; R₁, R₃, R₄ і R₅, однакові чи різні, означають атом водню чи радикал SO₃M; R₁ і R₆ однакові чи різні, означають атом водню чи радикал SO₃M чи COCH₃; і M означає натрій, кальцій, магній чи калій чи їхні суміші.

Названу реакцію проводять у водному середовищі при температурі від 40 до 80°C і pH від 10 до 3.

Як можливо використовуваний гідроксид лужного металу можна назвати гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид літію і гідроксид цезію.

Як можливо використовуваний гідроксид четвертинного амонію можна назвати гідроксид тетрабутиламонію.

Кількість гідроксиду лужного металу чи четвертинного амонію повинна бути достатньою для того, щоб значення pH реакційного середовища під час реакції зберігалось постійним. Для цієї мети гідроксид лужного металу чи четвертинного амонію необхідно додавати безупинно протягом усієї реакції.

Гідроксид лужного металу чи четвертинного амонію використовується переважно у вигляді 1-5%-ного водного розчину.

Реакцію проводять переважно при температурі від 60 до 70°C.

pH реакційного середовища переважно дорівнює 11-12,5.

Реакцію зупиняють шляхом підкислення реакційного середовища, наприклад додаванням кислоти смоли, такої як смола Amberlite IR120^R (Fluka).

Олігасахариди формули I можуть бути, при необхідності, очищені за допомогою гель-проникаючої хроматографії на гелі типу поліакриламід-агароза, такому як гель, що поставляється під маркою Ultrogel ACA202^R (Biosepra), відповідно до пропису приведеного нижче для розділення проміжних олігасахариди формули II. Олігасахариди формули I, у яких n дорівнює 0 чи 1, також можуть бути, у разі потреби, очищені на колонці з окисом алюмінію з використанням суміші вода-етанол як елюента.

Проміжні олігасахариди формули II і їх суміші можуть бути отримані розділенням за допомогою гелевої хроматографії суміші олігасахаридів III, отриманої ферментативною деполімеризацією гепарину чи лужною деполімеризацією бензильного ефіру гепарину чи напівсинтетичного бензильного ефіру гепарину.

Названу вище хроматографію проводять на колонках, заповнених гелем типу поліакриламід-агароза, що поставляється маркою Ultrogel ACA 202^R Biosepra). Переважно використовують батарею колонок з поліакриламід-агарозним гелем. Число використовуваних колонок залежить від обсягу, гелю і олігасахаридів, які підлягають розділенню. Суміш елюють за допомогою розчину, що містить фосфатний буфер і хлорид натрію. Фосфатний буфер являє собою переважно 0,02моль/л розчин NaH₂PO₄/NaHPO₄ (pH 7), який містить 0,1моль/д хлориду натрію. Детекцію різних фракцій здійснюють за допомогою УФ спектрометрії (254nm) і іонної спектрометрії (IBF). Одержувані при цьому фракції можуть бути потім при необхідності очищені, наприклад за допомогою хроматографії SAX (strong anion exchange) з використанням відомих фахівцям способів, зокрема способів описаних K.G.Rice і R.J.Linhardt, Carbohydrate Research, 219-233 (1989), A.Lamkjaer, S.H.Hansen і P.B.Ostergaard, Carbohydrate Research, 266, 37-52 (1995) і в патенті WO 90/01501 (приклад 2). Фракції після цього ліофілізують і потім збезсолюють на заповненій гелем колонці, такій як колонка з гелем Sephadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Якщо очищення здійснюють, не користуючись допомогою хроматографії SAX, ліофілізати можуть бути очищені простим осадженням чи піддані фракціонуванню за допомогою відомих фахівцям способів, зокрема

за допомогою способу, описаного в патенті FR 2548672. У загальному випадку операції проводять у відповідності з наступним прописом:

ліофілізовану фракцію, що очищається розчиняють при 25°C в приблизно десятих об'ємах дистильованої води. За допомогою додавання метанолу чи етанолу осаджують бажаний олігасахарид, контролюючи його чистоту за допомогою хроматографії РХВР (рідинної хроматографії високої розділюючої здатності). Додавання метанолу чи етанолу визначають у залежності від бажаних чистоти чи виходу олігасахариду. Ця операція може бути проведена в кілька послідовних етапів, виходячи з початкового розчину ліофілізату. З цією метою агент для висолювання (метанол чи етанол) додають малими порціями, відокремлюючи після кожного додавання осад, що утвориться. Отримані в такий спосіб осад аналізують за допомогою хроматографії РХВР. У залежності від бажаних чистоти та виходу збирають відповідні їм фракції осаду.

Для проміжних продуктів формули II, у яких $n=0,1$ чи 2, доцільно виходити із суміші III, одержуваної за допомогою ферментативної деполімеризації.

Цю деполімеризацію проводять з використанням гепаринази I (ЕС 4.2.2.7) у розчині фосфатного буферу з рН 7 у присутності хлориду натрію і БСА (бичачого сироваткового альбуміну) при температурі в межах від 10 до 18°C, переважно при 15°C, протягом 8-10 діб, переважно 9 діб. Деполімеризація може бути зупинена, наприклад, нагріванням реакційного середовища до 100°C протягом 2хв, а суміш може бути виділена ліофілізацією. На 25г гепарину переважно використовують 7меж.од. гепаринази I. Фосфатний буфер звичайно містить 0,05моль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ (рН 7) у присутності 0,1моль/л хлориду натрію. Концентрація БСА звичайно складає 2%.

Для проміжних продуктів формули II, у яких $n=0, 1, 2, 3$ чи 4, доцільно виходити із суміші III, одержуваної деполімеризацією бензилового ефіру гепарину.

Бензиловий ефір гепарину може бути отриманий за допомогою методів, описаних у патентах US 5389618, EP 40144, FR 2548672. Ступінь естерифікації в цьому випадку складає від 50 до 100%, переважно від 70 до 90%.

Деполімеризацію проводять у водному середовищі за допомогою гідроксиду лужного металу (наприклад, гідроксиду літію, гідроксиду натрію, гідроксиду калію чи гідроксиду цезію) чи гідроксиду четвертинного амонію (наприклад, гідроксиду тетрабутиламонію) переважно в молярній концентрації від 0,1 до 0,2моль/л при температурі від 40 до 80°C протягом від 5 до 120хв. У кращому варіанті реакцію проводять протягом 5-15хв при температурі від 60 до 70°C з використанням 0,15моль/л розчину гідроксиду натрію. Реакцію деполімеризації зупиняють за допомогою нейтралізації, додаючи кислоту, таку як оцтова кислота. Після додавання 10% мас/об ацетату натрію суміш олігасахаридів осаджують, додаючи метанол переважно в кількості 2 об'ємів на 1 об'єм реакційного середовища, після чого суміш фільтрують.

Відповідно до переважного аспекту винаходу, суміш олігасахаридів, отриману після хімічної деполімеризації у вигляді водного розчину, збагачують за допомогою ультрафільтрації на мембранах з відповідною номінальною межею розділення (типу Peliicon з регенованої целюлози, що поставляються фірмою Millipore), причому тип мембрани підбирають відповідно до типу збагачених олігасахаридів, що виділяються. Для олігасахаридів II, у яких $n=0$, використовують мембрану з номінальною межею розділення 1кДа, для олігасахаридів II, у яких $n=1$, використовують мембрану 1кДа чи 3кДа, для олігасахаридів II, у яких $n=2$, використовують мембрану 3кДа, для олігасахаридів II, у яких $n=3$ чи 4, використовують мембрану 5кДа. У процесі цієї операції збирають фільтрат, а затриманий матеріал відкидають. У результаті операції фракція збагаченого продукту може складати від 50 до 100% вихідної суміші олігасахаридів, містячи при цьому не менш 80% бажаного олігасахариду.

Для проміжних продуктів формули II, у яких $n=$ від 0 до 25, доцільно виходити із суміші III, одержуваної деполімеризацією напівсинтетичного бензилового ефіру полісахарид-сульфату. Напівсинтетичний бензиловий ефір полісахарид-сульфату одержують з напівсинтетичних полісахарид-сульфатів, одержуваних з полісахариду K5 за допомогою методів, описаних у патентах WO 94/29352 і WO 96/14425. Умови естерифікації, деполімеризації і виділення такі ж, як ті, котрі описані вище для бензилового ефіру гепарину.

У всіх описаних вище способах вихідний гепарин може бути отриманий від свині, вівці, кози чи бика і може бути взятий зі слизу, легень чи шкіри тварин. Переважно використовують гепарин зі слизу свині, вівці чи з легень бика, причому переважніше зі слизу свині.

Олігасахариди формули I мають протизапальні властивості і можуть, таким чином, бути використані для профілактики чи лікування хвороб, пов'язаних із запальним процесом, при якому відбувається продукція цитотоксичних речовин, таких як закис азоту (NO), і при якому вивільняється його форма, що піддається індукції, зокрема нейтрофілами чи макрофагами, коли останні мігрують і активуються в тканині. Активація, міграція, злипання й інфільтрація нейтрофілів відбуваються в порушених ішемією зонах тканини в результаті закупорки чи спазму артерії, що живить цю тканину. Такі ішемії можуть виникати чи в головному мозку (порушення мозкового кровообігу), чи в серцевому м'язі (інфаркт міокарда), чи в нижніх кінцівках (так звані периферичні ішемії). Олігасахариди формули I можуть бути, таким чином, використані для профілактики і/чи лікування нейродегенеративних захворювань, у випадку яких запалення мозку відіграє руйнуючу роль з можливим летальним результатом, з яких можна назвати церебральні ішемії, ішемії серця (інфаркт міокарда), периферичні ішемії, ушкодження центральної нервової системи і, зокрема, черепні, спинномозкові і черепно-спинномозкові травми, розсіяний склероз, невропатичні болі і периферичні невропатії, захворювання рухових нейронів, у тому числі бічний аміотрофічний склероз, нейро-СНІД, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона і хорея Гентінгтона, і деякі форми остеоартритів, зокрема локалізованих у суглобах.

Протизапальна активність цих продуктів доведена *in vivo* у тесті на продукцію NOx (нітрит і нітрат), індуковану ліпополісахаридом (LPS), отриманим від *E.coli* способом, описаним M.Yamashita із сотр., Eur. J. Pharmacol., 338, 2,151-158 (1997) чи J.E.Shellito із сотр., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 13,1,45-53 (1995).

Мишам-сцям CD1 (Charles River, 25-35г) вводять внутрішньовенно в момент часу TO 0,5мг/кг олігасахариду у вигляді кульок, у момент часу T+15хв підшкірно 1 чи 2мг/кг олігасахариду. У момент часу T+30хв вводять 100мг/кг ліпополісахариду (LPS), отриманого від *E.coli* (Sigma L3129, серотип 0127:Y8). У

момент часу T+3 години знову вводять підшкірно 1 чи 2мг/кг олігасахариду. У момент часу T+5 годин 30хв за допомогою очної пункції відбирають пробу крові і визначають концентрації NOx (нітрит і нітрат) у плазмі, використовуючи колориметричний метод Грісса після відновлення нітрату в нітрит за допомогою нітратредуктази в такий спосіб:

12μл зразка плазми змішують з 88μл деіонізованої води та інкубують у темряві протягом 1 години при кімнатній температурі з 40μл фосфатного буферу (0,31М, рН 7,5), 20μл β-НАДФН (відновлений нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфат) (0,86ММ), 20μл ФДА (флавінаденіндинуклеотид) (0,11ММ) і 20μл нітратредуктази (2од./мол) (Boehringer Mannheim). Додають 10μл ZnSO₄ (1М) для осадження білків, і після змішування зразки центрифугують при 20000g протягом 5хв. На закінчення 50μл супернатанту інкубують протягом 10хв при кімнатній температурі з 100μл реактиву Грісса (1%-ний розчин сульфаніламіду в 0,1%-ному розчині суміші фосфорна кислота/нафтилетилендіамін у деіонізованій воді (об/об)). Оптичну густину вимірюють при 540nm на мікропластинчастому спектрофотометрі, роблячи по два виміри на кожну точку. Як стандарт у колориметричному методі використовують KNO₃ і NaNO₂.

Олігасахариди винаходу в названому дослідженні інгібують утворення NOx більш ніж на 50%.

З кращих олігасахаридів формули I можна, зокрема назвати олігасахариди, у яких:

п дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і М означає натрій, і суміш його діастеріоізомерів,

п дорівнює 1, R₁, R₂, R₃ і R₅ і R₆ означають радикал SO₃Na, R₄ означає атом водню і М означає натрій, і суміш його діастеріоізомерів,

п дорівнює 2, R₁, R₂, R₃ і R₅ і R₆ означають радикал SO₃Na, R₄ означає атом водню і М означає натрій, і суміш його діастеріоізомерів,

п дорівнює 2, R₁, R₂, R₃ і R₆ означають радикал SO₃Na, R₅ означає атом водню чи радикал SO₃Na, R₄ означає атом водню і М означає натрій, і суміш його діастеріоізомерів (похідне 1,6-ангідро-∇Is-Is).

Одержання олігасахаридів формули I і проміжних продуктів ілюструють наступні приклади.

У цих прикладах використовують наступні значення скорочень:

∇Is: (4-дезоксид-2-О-сульфо-α-L-трео-гексенпіранозилуронієва кислота)-(1→4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо-О-α-D-глюкопіраноза, тринатрієва сіль, чи ∇UAp2S-(1→4)-α-D-GlcNp2S6S,

Is: (2-сульфо-α-L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1→4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо-α-D-глюкопіраноза, тетранатрієва сіль, чи α-L-IdoAp2S-(1→4)-α-D-GlcNp2S6S,

IIIs: (α-L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1→4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо-α-D-глюкопіраноза, тринатрієва сіль, чи α-L-IdoAp2S-(1→4)-α-D-GlcNp2S6S,

IIIs: 2-сульфо-α-L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1→4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-α-D-глюкопіраноза, тринатрієва сіль чи α-L-IdoAp2S-(1→4)-α-D-GlcNp2S,

IdoAp ідопіранозилуронієва кислота,

GlcNp: 2-дезоксид-2-аміноглюкопіраноза,

∇UAp: 4-дезоксид-α-L-трео-гексенпіранозилуронієва кислота,

S: сульфат

Приклади одержання сумішей формули II

ПРИКЛАД А - одержання олігасахаридів формули II, у яких n=0, 1 і 2, ферментативною деполімеризацією і розділенням

Розчиняють 25г гепарину в 250мл розчину фосфатного буферу, що містить 0,05моль/л KaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (рН=7), 0,2моль/л хлориду натрію і 2% БСА (бичачого сироваткового альбуміну). У суміш вводять 7меж.од. гепаринази (ЕС 4.2.2.2.7) охолоджують отриманий розчин до 15 °С і витримують при цій температурі протягом усієї реакції деполімеризації. За протіканням реакції стежать шляхом ступінчатого відбору проб, аналізованих за допомогою геліпроникаючої хроматографії. Після закінчення 9 доби ферментативну реакцію зупиняють, нагріваючи реакційне середовище протягом двох хвилин при 100°С. Суміш після цього охолоджують і ліофілізують, одержуючи в такий спосіб суміш олігасахаридів III.

Отриману суміш олігасахаридів III хроматографують за наступною методикою: хроматографію проводять на колонках, заповнених поліакриламід-агарозним гелем, відомим за назвою Ultrogel ACA 202, і елюють суміш розчином, що містить фосфатний буфер (0,02моль/л NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), рН=7, і 0,1моль/л хлориду натрію. Детекцію здійснюють за допомогою УФ спектрометрії (254nm) і іонної спектрометрії (IBF). Продукти можуть бути потім при необхідності очищені за допомогою хроматографії SAX (strong anion exchange) чи фракційним осадженням згідно Методу, описаному в патенті FR 2548672. Виділені фракції продукту ліофілізують і потім збезсолюють на колонці, заповненій гелем Sephadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Використовуючи цю методику, одержують 3г дисахариду Is і 1100мг суміші гексасахариду, що містить, як правило, похідного ∇Is—Is-Is, 35% ∇Is-Is-IIIs і 10% ∇Is-Is-IIIs. Ця суміш може бути очищена з використанням відомих фахівцям способів, що дозволяють виділити кожний з компонентів, чи використана як така для перетворення в 1,6-ангідро-похідні формули I. Слід зазначити, що в процесі цього перетворення гексасахарид ∇Is-Is-IIIs не може дати сполук формули I.

ПРИКЛАД В - одержання олігасахаридів формули II, у яких n=0, 1, 2, 3 чи 4, деполімеризацією бензильового ефіру гепарину і розділенням

а. Одержання бензильового ефіру гепарину

Бензильовий ефір гепарину одержують як описано в прикладі 2 патенти US 5389618.

б. Деполімеризація

Розчиняють 100г бензильового ефіру гепарину в 1,9л демінералізованої води. Суміш нагрівають до 60°С при перемішуванні. Після утворення гомогенного розчину вводять в один прийом приблизно 35мл 23%-ного розчину гідроксиду натрію. Після проведення реакції протягом 10хв розчин охолоджують і нейтралізують 80мл приблизно 2н. розчину оцтової кислоти. До отриманого розчину додають 10% мас/об ацетату натрію. Суміш олігасахаридів осаджують додаванням приблизно 2 об'ємів метанолу. Осад відокремлюють фільтрацією, двічі промивають метанолом і сушать при 50°С і зниженому тиску. Після висушування одержують 73,8г суміші

олігасахаридів II.

с. Збагачення олігасахариду з $n=1$

Розчиняють 30г отриманої вище суміші олігасахаридів у приблизно 35 об'ємах води. Цей розчин піддають ультрафільтрації на мембрані ЗкДа (Pellicon). Після одержання 600мл фільтрату затриману частину розбавляють 500мл води. Продовжують операцію до одержання додаткових 450мл фільтрату. Обидві фракції фільтрату об'єднують і потім до суха випарюють при зниженому тиску. Одержують 6,1г жовтувато-білої твердої речовини. Аналіз цієї речовини за допомогою геліпроникаючої хроматографії вказує на зміст у ньому приблизно 30% олігасахаридів формули II, у яких $n=1$.

d. Фракціонування підданих ультрафільтрації сумішей олігасахаридів

Збагачену суміш фракціонують на колонках, заповнених поліакриламід-агарозним гелем, відомим за назвою Ultrogel ACA 202 (використовують 4 послідовно розташовані колонки з діаметром 10см і висотою 50см). 5г збагаченої ультрафільтрацією суміші розчиняють у 25мл води, після чого елюють 0,2моль/л розчином хлориду натрію зі швидкістю 5мл/хв. Відбирають з низу колонки фракції по 25мл. Детекцію продуктів здійснюють за допомогою УФ спектрометрії (254nm) і іонної спектрометрії (IBF). Фракції продукту з $n=1$ виділяють, ліофілізують і потім збезсолують на колонці, заповненій гелем Sephadex G10. Після ліофілізації одержують 1г тетрасахариду, що містить, як правило, 70% похідного Vis-Is формули II (R_1, R_2, R_3 і R_5 і R_6 означають радикал SO_3Na , $R_4=H$ і $M=Na$). Похідне Vis-Is може бути при необхідності очищене за допомогою хроматографії SAX (strong anion exchange) чи, що є кращим, фракційним осадженням згідно з методом, описаним в патенті FR 2548672.

ПРИКЛАД 1

У реактор при температурі 66°C завантажують 5мл 0,0063моль/л розчину гідроксиду натрію. Вимірюють рН розчину і приймають його значення за необхідне (рН 11,35). Додають при перемішуванні в один прийом 30мг олігасахариду формули II, у якого n дорівнює 0, R_1 і R_6 означають радикал SO_3Na і M означає натрій. Після цього коректують рН і підтримують його рівним 11,35 за допомогою безупинного додавання 0,5моль/л розчину гідроксиду натрію. Через 10 годин додавання гідроксиду натрію припиняють і реакційну суміш охолоджують до 25°C. Після цього доводять рН розчину до 6-7, додаючи смола Amberlite IR 120. Суміш фільтрують на мембрані Whatman GF/B і до суха випарюють при зниженому тиску (2,7кПа) при температурі, близькій до 25°C. Продукт забирають 0,5мл дистильованої води і ліофілізують, одержуючи 29мг суміші діастереоізомерів олігасахариду формули I, у якого n дорівнює 0, R_1 і R_6 означають радикал SO_3Na і M означає натрій [(4-дезоксид-2-О-сульфо- α -L-трео-гекс-4-енпіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-1,6-ангідро-2-дезоксид-2-сульфаміно- β -D-маннопіраноза, тринатрієва сіль: спектр ПМР у D_2O , 400мгц, T=298K, δ у м.д.: 3,15(1H, с, H2), 3,75(2H, м, H6 і H3), 3,88(1H, м, H4), 4,20(1H, д, J=8Гц, H6), 4,22(1H, т, J=5Гц, H3'), 4,58(1H, м, H2'), 4,75(1H, м, H5), 5,53(1H, с, H1), 5,60(1H, дд, J=6 і 1Гц, H1'), 6,03(1H, д, J=5Гц, H4'); (4-дезоксид-2-О-сульфо- α -L-трео-гекс-4-енпіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-1,6-ангідро-2-дезоксид-2-сульфаміно- β -D-глюкопіраноза, тринатрієва сіль): спектр ПМР у D_2O , 400мгц, T=298DO, δ у м.д.: 3,34(1H, дд, J=7 і 2Гц, H2), 3,72(1H, т, J=8Гц, H6), 3,90(1H, м, H3), 4,03(1H, з, H4), 4,20(1H, д, J=8Гц, H6), 4,23(1H, т, J=5Гц, H3'), 4,58(1H, м, H2'), 4,78(1H, м, H5), 5,50(1H, з, H1), 5,60(1H, дд, J=6 і 1Гц, H1'), 6,03(1H, д, J=5Гц, H4')].

ПРИКЛАД 2

У реактор при температурі 62°C завантажують 33,3 мол 0,0063моль/л розчину гідроксиду натрію. Вимірюють рН розчину і приймають його значення за необхідне (рН 11,15). Додають при перемішуванні в один прийом 200мг олігасахариду формули II, у якого n дорівнює 1, R_1, R_2, R_3, R_5 і R_6 означають радикал SO_3Na , R_4 означає атом водню і M означає натрій. Після цього коректують рН і підтримують його рівним 11,15 за допомогою безупинного додавання 0,5моль/л розчину гідроксиду натрію. Через 12 годин додавання гідроксиду натрію припиняють і реакційну суміш охолоджують до 25°C. Після цього доводять рН розчину до 6-7, додаючи смола Amberlite IR 120. Суміш фільтрують на мембрані Whatman GF/B і до суха випарюють при зниженому тиску (2,1кПа) при температурі близькій до 25°C. Продукт забирають 3мл дистильованої води і ліофілізують, одержуючи 230мг олігасахариду формули I, у якого n дорівнює 1, R_1, R_2, R_3, R_5 і R_6 означають радикал SO_3Na , R_4 означає атом водню і M означає натрій, у вигляді суміші діастереоізомерів [(4-дезоксид-2-О-сульфо- α -L-трео-гекс-4-енпіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо- α -О-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)-(2-О-сульфо- α -L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-1,6-ангідро-2-дезоксид-2-сульфаміно- β -D-маннопіраноза, гептанатрієва сіль): спектр ПМР у D_2O , 400мгц, T=298K, δ у м.д.: 3,15(1H, с, H2), 3,25(1H, м, H2"), 3,60(1H, м, H3"), 3,70-4,70(14H, масив, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4'/H5'/H6", H2'''/H3'''), 4,75(1H, м, H5), 5,20-5,40(2H, м, H1' і H1"), 5,45 (1H, м, H1"), 5,56(1H, м, H1), 5,94(1H, д, J=5Гц, H4); [(4-дезоксид-2-О-сульфо- α -L-трео-гекс-4-енпіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо- α -О-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)-(2-О-сульфо- α -L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-1,6-ангідро-2-дезоксид-2-сульфаміно- β -D-глюкопіраноза, гептанатрієва сіль) : спектр ПМР у D_2O , 400мгц, T=298K, δ у м.д.: 3,25(1H, м, H2"), 3,42(1H, дд, J=4 і 1Гц, H2), 3,60(1H, м, H3"), 3,70-4,70 (14H, масив, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4'/H5'/H6", H2'''/H3'''), 4,75(1H, м, H5), 5,20-5,40 (2H, м, H1' і H1"), 5,45 (1H, м, H1"), 5,52(1H, м, H1), 5,94(1H, д, J=5Гц, H4)].

ПРИКЛАД 3

У реактор при температурі 62°C завантажують 16,7мл 0,0063моль/л розчину гідроксиду натрію. Вимірюють рН розчину і приймають його значення за необхідне (рН 11,7). Додають при перемішуванні в один прийом 100мг олігасахариду формули II, у якого n дорівнює 2, R_1, R_2, R_3, R_5 і R_6 означають радикал SO_3Na , R_4 означає атом водню і M означає натрій. Після цього коректують рН і підтримують його рівним 11,7 за допомогою неперервного додавання 0,5моль/л розчину гідроксиду натрію. Через 10 годин додавання гідроксиду натрію припиняють і реакційну суміш охолоджують до 25°C. Після цього доводять рН розчину до 6-7, додаючи смола Amberlite IR 120. Суміш фільтрують на мембрані Whatman GF/B і до суха випарюють при зниженому тиску (2,7кПа) при температурі близькій до 25°C. Продукт забирають 3мл дистильованої води і ліофілізують, одержуючи 108мг олігасахариду формули I, у якого n дорівнює 2, R_1, R_2, R_3, R_5 і R_6 означають радикал SO_3Na , R_4 означає атом водню і M означає натрій, у вигляді суміші діастереоізомерів. Означають символами від А до

F цукри, котрі утворюють гексасахариди, де А являє собою залишок 1,6-анигідро й F-залишок ненасиченої уронієвої кислоти. [((4-дезоксид-2-О-сульфо- α -L-трео-гекс-4-єніпіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо- α -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)-(2-О-сульфо- α -L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо- α -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)-(2-О-сульфо- α -L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-1,6-ангідро-2-дезоксид-2-сульфаміно- β -D-маннопіраноза, ундеканатрієва сіль): спектр ПМР у D₂O, 600мгц, T=298K, δ у м.д.: 3,15(1H, с, H₂ (A)), 3,25(2H, м, H₂(C+E)), 3,60(2H, м, H₃(C+E)), 3,65-4,50(19H, масив, H₂(B+D)/H₃(A+B+D+F)/H₄(A+B+C+D+E)/H₅(C+E)/H₆(A+C+E)), 4,60(1H, С, H₂(F)), 4,80(3H, м, H₅(A+B+D)), 5,18(1H, С, H₁(D)), 5,30(1H, С, H₁(B)), 5,34(1H, д, H₁(C)), 5,36(1H, д, H₁ (E)), 5,46(1H, 3, H₁(E)), 5,57 (1H, 3, H₁ (A)), 5,95 (1H, д, J=5Гц, H₄ (F)); 4-дезоксид-2-О-сульфо- α -L-трео-гекс-4-єніпіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-2-дезоксид-2-сульфаміно-6-О-сульфо- α -D-глюкопіранозил-(1 \rightarrow 4)-(2-О-сульфо- α -L-ідопіранозилуронієва кислота)-(1 \rightarrow 4)-1,6-ангідро-2-дезоксид-2-сульфаміно- β -D-глюкопіраноза, ундеканатрієва сіль): спектр ПМР у Р₂O, 600мгц, T=298K, δ у м.д.: 3,25(2H, м, H₂ (C+E)), 3,42 (1H, м, H₂(A)), 3,60(2H, м, H₃(C+E)), 3,65-4,50(19H, масив, H₂(B+D)/H₃(A+B+D+F)/H₄(A+B+C+D+E)/H₅(C+E)/H₆(A+C+E)), 4,60(1H, с, H₂(D)), 4,80(3H, м, H₅(A+B+D)), 5,18(1H, с, H₁(D)), 5,31(1H, с, H₁(B)), 5,34(1H, д, H₁(C)), 5,36(1H, д, H₁(E)), 5,46(1H, с, H₁(F)), 5,52(1H, с, H₁(A)), 5,95(1H, д, J=5Гц, H₄(F)).

ПРИКЛАД 4

У реактор при температурі 62°C завантажують 4мл 0,0316моль/л розчину гідроксиду натрію. Вимірюють рН розчину й приймають його значення за необхідне (рН 11,8). Додають при перемішуванні в один прийом 100,8мг суміші олігосахаридів формули II, у котрих n дорівнює 2, що містить 55% похідного ∇ Is-Is-Is (R₁, R₂, R₃ і R₆ означають радикал SO₃Na, R₅ означає атом водню і M означає натрій), 35% ∇ Is-Is-Is (R₁, R₂, R₃, R₅ і R₆ означають радикал SO₃Na, R₄ означає атом водню і M означає натрій) й 10% ∇ Is-Is-Is (R₁, R₂, R₃, R₅ і R₆ означають радикал SO₃Na, R₄ означає атом водню і M означає натрій, причому функція SO₃M у вуглець C6 замінена воднем). Після цього коректують рН й підтримують його рівним 11,8 за допомогою неперервного додавання 0,5моль/л розчину гідроксиду натрію. Через 11 годин додавання гідроксиду натрію припиняють й реакційну суміш охолоджують до 25°C. Після цього доводять рН розчину до 6-7, додаючи смола Amberlite IR 120. Суміш фільтрують на мембрані Whatman GF/B й до суха випарюють при зниженому тиску (2,7кПа) при температурі близькій до 25°C. Продукт забирають 1,5мл дистильованої води й ліофілізують, одержуючи 110мг суміші олігосахаридів формули I, у котрих n дорівнює 2, що містить, зокрема, похідне 1,6-ангідро- ∇ Is-Is-Is (R₁, R₂, R₃, R₅ і R₆ означають радикал SO₃Na, R₄ означає атом водню і M означає натрій) й похідне 1,6-ангідро- ∇ Is-Is-Is (R₁, R₂, R₃, і R₆ означають радикал SO₃Na, R₅ означає атом водню і M означає натрій). Аналіз за допомогою РХВР (рідинної хроматографії високої розділюючої здатності) у режимі іонних пар дозволяє стежити за перетворенням похідних формули I.

Отримані дані РХВР вказують на те, що перетворення здійснюється з похідними ∇ Is-Is-Is і ∇ Is-Is-Is.

ПРИКЛАД 5

У реактор при температурі 66°C завантажують 8,6мл 0,025моль/л розчину гідроксиду літію. Вимірюють рН розчину і приймають його значення за необхідне (рН 11,68). Додають при перемішуванні в один прийом 50мг олігосахариду формули II, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій. Після цього коректують рН і підтримують його рівним 11,68 за допомогою безупинного додавання 0,466моль/л розчину гідроксиду літію. Через 8 годин додавання гідроксиду літію припиняють і реакційну суміш охолоджують до 25°C. Аналіз за допомогою РХВР (рідинної хроматографії високої розділюючої здатності) у режимі іонних пар дозволяє стежити за перетворенням похідного формули I, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій чи літій. Отримані дані РХВР вказують на те, що перетворення здійснюється на 100%. Вихід кінцевого продукту на підставі порівняння з еталонними даними складає 81,2%.

ПРИКЛАД 6

У реактор при температурі 66°C завантажують 8,3мл 0,0063моль/л розчину гідроксиду калію. Вимірюють рН розчину і приймають його значення за необхідне (рН 11,1). Додають при перемішуванні в один прийом 50мг олігосахариду формули II, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій. Після цього коректують рН і підтримують його рівним 11,1 за допомогою безупинного додавання 0,515моль/л розчину гідроксиду калію. Через 24 години додавання гідроксиду калію припиняють і реакційну суміш охолоджують до 25°C. Аналіз за допомогою РХВР (рідинної хроматографії високої розділюючої здатності) у режимі іонних пар дозволяє стежити за перетворенням похідного формули I, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій чи калій. Отримані дані РХВР вказують на те, що перетворення здійснюється на 100%. Вихід на підставі порівняння з еталонними даними складає 75,6%.

ПРИКЛАД 7

У реактор при температурі 66°C завантажують 8,3мл 0,0063моль/л розчину гідроксиду цезію. Вимірюють рН розчину і приймають його значення за необхідне (рН 10,75). Додають при перемішуванні в один прийом 50мг олігосахариду формули II, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій. Після цього коректують рН і підтримують його рівним 10,75 за допомогою безупинного додавання 0,476моль/л розчину гідроксиду цезію. Через 20 годин додавання гідроксиду цезію припиняють і реакційну суміш охолоджують до 25°C. Аналіз за допомогою РХВР (рідинної хроматографії високої розділюючої здатності) у режимі іонних пар дозволяє стежити за перетворенням похідного формули I, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій чи цезій. Отримані дані РХВР вказують на те, що перетворення здійснюється на 90,3%. Вихід на підставі порівняння з еталонними даними складає 73%.

ПРИКЛАД 8

У реактор при температурі 66°C завантажують 8,3мл 0,0063моль/л розчину гідроксиду тетрабутиламмонію. Вимірюють рН розчину і приймають його значення за необхідне (рН 10,95). Додають при перемішуванні в один прийом 50мг олігосахариду формули II, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій. Після цього коректують рН і підтримують його рівним 10,95 за допомогою

безупинного додавання 0,521моль/л розчину гідроксиду тетрабутиламмонію. Через 16 годин додавання гідроксиду цезію припиняють і реакційну суміш охолоджують до 25°C. Аналіз за допомогою РХВР (рідинної хроматографії високої розділюючої здатності) у режимі іонних пар дозволяє стежити за перетворенням похідного формули I, у якого n дорівнює 0, R₁ і R₆ означають радикал SO₃Na і M означає натрій чи тетрабутиламмоній. Отримані дані РХВР вказують на те, що перетворення здійснюється на 96,7%. Вихід на підставі порівняння з еталонними даними складає 65%.

Лікувальні засоби згідно з винаходом містять як активний початок щонайменше один олігасахарид формули I чи суміш олігасахаридів формули I у вигляді композиції, у якій активний початок асоційований з будь-яким іншим фармацевтично сумісним продуктом, що може бути як інертним, так і фізіологічно активним. Лікувальні засоби згідно з винаходом можуть застосовуватися внутрішньовенно, підшкірно, перорально, ректально, місцево і пульмонарно (інгаляцією).

Стерильні композиції для внутрішньовенного і підшкірного застосування звичайно є водними розчинами. Ці композиції можуть також містити адьюванти, зокрема змочувальні, ізотонізуючі, емульгуючі, диспергуючі і стабілізуючі агенти. Стерилізація може бути здійснена різними способами, наприклад асептичною фільтрацією, введенням у композицію агентів, що стерилізують, опроміненням. Ці композиції можуть бути також виготовлені у вигляді твердих стерильних композицій, що безпосередньо перед застосуванням можуть бути розчинені в стерильній воді чи в будь-якому іншому придатному для ін'єкцій стерильному середовищі.

Як тверді композиції для перорального застосування можуть бути використані таблетки, пігулки, порошки (желатинові капсули, крохмальні облатки) чи гранули. Активний початок у композиціях змішують у струмі аргону з одним чи декількома інертними розріджувачами, такими як крохмаль, целюлоза, сахароза, лактоза чи ремнезем. Ці композиції можуть також містити інші, відмінні від розріджувачів, речовини, наприклад один чи кілька маслянистих матеріалів, таких як стеарат магнію чи тальк, агент, що сприяє всмоктуванню при пероральному застосуванні, барвник, оболонка (драже) чи лак.

Як рідкі композиції для перорального застосування можна використовувати фармацевтично прийнятні розчини, суспензії, емульсії, сиропи й еліксири, що містять інертні розріджувачі, такі як вода, етиловий спирт, гліцерин, рослинні олії чи парафінова олія. Ці композиції можуть містити інші, відмінні від розріджувачів, речовини, що наприклад змочують, підсолоджують, загущують, ароматизують або стабілізуючі продукти.

Композиціями для ректального застосування є суппозиторії чи ректальні капсули, що крім активного продукту містять ексципієнти, такі як олія какао, напівсинтетичні гліцериди чи поліетиленгліколи.

Композиції для місцевого застосування можуть, наприклад, являти собою креми, лосьйони, очні краплі, полоскання, краплі для носа чи аерозолі.

Дози залежать від бажаного ефекту, від тривалості лікування і від шляху введення. Звичайно вони складають від 0,5 до 10мг/кг на добу при підшкірному застосуванні, що відповідає добовій дозі від 3 до 60мг для дорослої людини вагою 60кг.

У загальному випадку лікар повинний визначити придатну дозу в залежності від віку, ваги і всіх інших факторів, пов'язаних з процесом лікування конкретної особи.

Винахід відноситься також до способу попередження і лікування хвороб, зв'язаних із запальним процесом, при якому відбувається продукція цитотоксичних речовин, таких як закис азоту (NO). Олігасахариди формули I можуть у такий спосіб бути використані для попередження і/чи лікування нейродегенеративних захворювань, у випадку яких запалення мозку відіграє руйнуючу роль з можливим летальним результатом, з яких можна назвати ішемії центральної нервової системи, церебральні ішемії, ішемії сітківки і внутрішнього вуха, ішемії серця (інфаркт міокарда), периферичні ішемії, ушкодження центральної нервової системи і, зокрема черепні, спинномозкові і черепно-спинномозкові травми, травми сітківки і внутрішнього вуха, розсіяний склероз, невропатичні болі і периферичні невропатії, захворювання рухових нейронів, у тім числі бічний аміотрофічний склероз, нейро-СНІД, хворобу Альцгеймера, хвороба Паркінсона і хорея Гентінгтона, і деякі форми остеоартритів, зокрема, локалізованих у суглобах.