



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0044512

(51)⁷ A61K 31/7016; A61K 31/7032; A61K 31/715; A61K 31/734; A61P 25/28; C08B 37/04; C07H 1/00; C07H 15/04; C07H 3/04; C07H 3/06; C08B 37/00; A61K 31/702; A61P 9/00

(13) B

(21) 1-2019-03798

(22) 27/12/2017

(86) PCT/CN2017/118843 27/12/2017

(87) WO 2018/121559 05/07/2018

(30) PCT/CN2016/113879 30/12/2016 CN

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/12/2019 381A

(71) 1. SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

421 Niudun Road, Zhang Jiang Hi-Tech Park, Pudong New Area, Shanghai 201203, China

2. SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES (CN)

555 Zuchongzhi RD., Zhangjiang, Hi-Tech Park, Pudong New Area Shanghai 201203, China

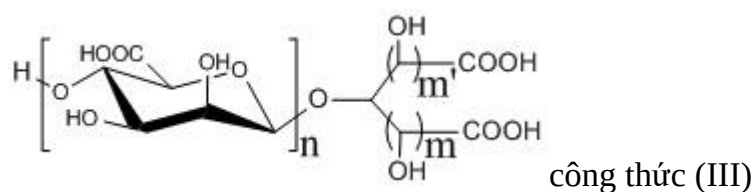
(72) GENG, Meiyu (CN); DING, Jian (CN); ZHANG, Zhenqing (CN); XIAO, Zhongping (CN); DU, Xiaoguang (CN); XIN, Xianliang (CN).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) CHẾ PHẨM OLIGOSACARIT CỦA ĐİAXIT MANNURONIC, DƯỢC PHẨM VÀ SẢN PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE CHỨA CHẾ PHẨM NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM NÀY

(21) 1-2019-03798

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic, bao gồm điaxit mannuronic có công thức (III) hoặc muối được dụng của nó, trong đó n là số nguyên từ 1 đến 9, m là 0, 1 hoặc 2, và m' là 0 hoặc 1, và trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-5$ là 80-95% tổng trọng lượng chế phẩm, và tỷ lệ tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ với tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 4-7$ là trong phạm vi từ 1,0 đến 3,5. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến được phẩm và sản phẩm bảo vệ sức khỏe chứa chế phẩm này và phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

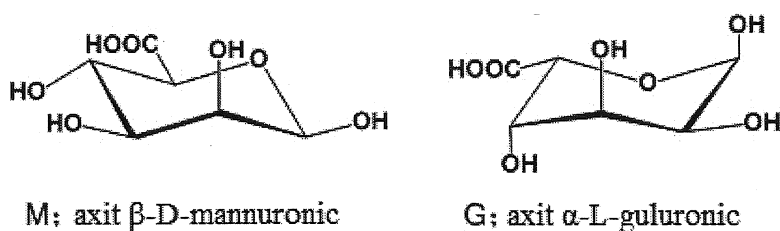
Sáng chế đề cập đến chế phẩm tối ưu của điaxit mannuronic thu được bằng phương pháp sàng lọc hoạt tính sinh học, mà sử dụng mẫu động vật mắc chứng lú lẫn để đánh giá hiệu quả của độ polyme hóa khác nhau và các tỷ lệ của điaxit mannuronic về hoạt tính sinh học của nó. Chế phẩm có hoạt tính sinh học tốt nhất được sàng lọc lần cuối và chất đích mong muốn được điều chế bằng sự phân tách của màng siêu lọc.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và sản phẩm bảo vệ sức khỏe chứa chế phẩm này và phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các điaxit mannuronic đã được chú ý rộng rãi do giá trị dược phẩm tiềm năng của chúng. Điaxit mannuronic thường được điều chế bằng phương pháp nhiều bước sử dụng axit alginic làm vật liệu thô.

Phân tử polysacarit của vật liệu thông, axit alginic, bao gồm phân đoạn M được tạo ra từ axit D-mannuronic liên kết bằng các liên kết β -1,4-glycosidic, phân đoạn G được làm từ axit L-guluronic liên kết bằng các liên kết α -1,4-glycosidic, và phân đoạn MG lai được tạo ra từ hai sacarit. Công thức cấu trúc của axit mannuronic và axit guluronic được thể hiện trong công thức (I) sau:



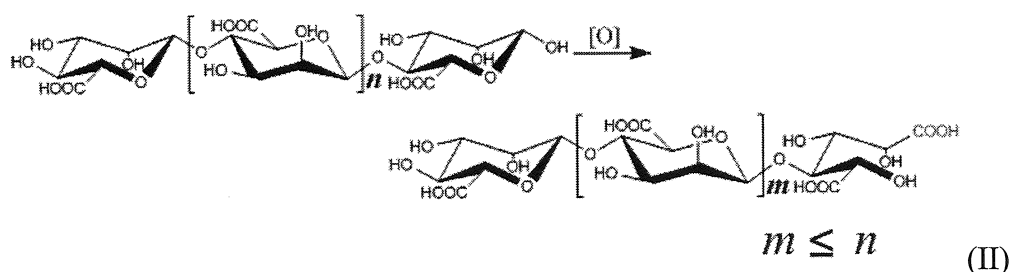
(I)

Các phân đoạn M và G có thể được tách từ vật liệu thô, axit alginic. Phương pháp chung có thể được mô tả đơn giản như sau: axit alginic được thoái biến sơ bộ để thu được hỗn hợp polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic; hỗn hợp

polysacarit là đối tượng để kết tủa axit để loại bỏ axit polyguluronic ở đó; và còn tiến hành tinh chế để thu được axit homopolymannuronic có độ tinh khiết 90% hoặc hơn (sau đây gọi là "chất trung gian phân đoạn M"). Xem, ví dụ, các phương pháp được bộc lộ trong đơn sáng chế Trung Quốc số 98806637.8 và CN02823707.2.

Axit oligomannuronic có thể được điều chế như sau: chất trung gian phân đoạn M thu được ở trên là đối tượng để giảm thêm tính axit bằng cách làm nóng dưới điều kiện axit để thu được polyme của axit mannuronic đoạn nhỏ có phạm vi trọng lượng phân tử mong muốn. Ngoài ra, hiệu quả làm giảm có thể được cải thiện bằng phương pháp làm thoái biến oxy hóa; trong khi đó, đuôi khử có thể được oxy hóa thành axit sacarit mở vòng, xem đơn sáng chế Trung Quốc số 200580009396.5 (tài liệu sáng chế 1) do Meiyu Geng, và đồng sự nộp và Patent Mỹ số 8,835,403 B2 (tài liệu sáng chế 2). Để thuận tiện, các tài liệu sáng chế 1 và 2 sau đây được đề cập chung đến là sáng chế trước, mà được kết hợp tổng thể để tham khảo.

Quy trình phản ứng của điaxit mannuronic được bộc lộ trong các sáng chế trước có thể được thể hiện bằng phương trình phản ứng (II) sau, đó là, nhóm aldehyt ở vị trí C1 của axit mannuronic ở đuôi khử của oligoaxit mannuronic polysacarit được oxy hóa thành nhóm cacboxyl.

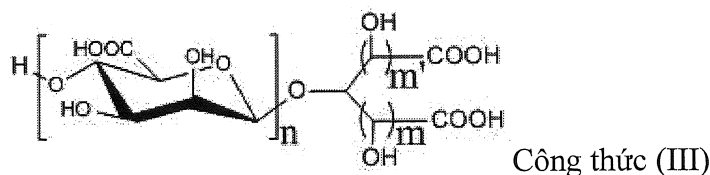


Trong quy trình chuyển đổi oxy hóa trên, chất oxy hóa được sử dụng chung là dung dịch đồng sulfat kiềm, tức là chất phản ứng Fehling. Các sáng chế trước chỉ cần áp dụng phương pháp oxy hóa này. Đặc biệt, trong điều kiện kiềm, chất nền phản ứng axit polymannuronic, tức là, chất trung gian phân đoạn M, được bổ sung vào dung dịch đồng sulfat và phản ứng được trong bể nước nóng trong 15 phút đến 2 giờ. Phương pháp này sử dụng ion Cu^{2+} làm chất oxy hóa để oxy hóa nhóm aldehyt, và chất kết tủa của đồng màu đỏ gạch được tạo ra trong phản ứng này. Phản ứng này thường được sử dụng để xác định đường bị khử.

Các sáng chế trước bộc lộ axit oligomannaric có hiệu quả chống lại bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease - AD) và bệnh đái tháo đường. Sự phát sinh bệnh Alzheimer và bệnh đái tháo đường tuýp 2 liên hệ chặt chẽ với các amyloid (β -amyloid và amylin). Các amyloid có thể tập hợp lại để tạo ra oligome protein, và còn có thể tập hợp lại để tạo ra sợi. Khối kết hợp protein này có tính độc bào, có thể cảm ứng phản ứng oxy hóa trong tế bào làm tổn thương ty thể, và có thể kích hoạt phản ứng theo đợt như là phản ứng viêm, gây tổn thương số lượng lớn noron và tế bào beta, và cuối cùng dẫn đến khởi phát bệnh Alzheimer và bệnh đái tháo đường tuýp 2. Axit oligomannaric hướng đích amyloid và gây phản tác dụng phản ứng theo đợt được cảm ứng bởi amyloid, và do đó có hiệu quả phòng trừ và điều trị bệnh Alzheimer và bệnh đái tháo đường tuýp 2.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề xuất chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic, bao gồm điaxit mannuronic có công thức (III) hoặc muối được dụng của nó:



trong đó n là số nguyên từ 1 đến 9, m là 0, 1 hoặc 2, và m' là 0 hoặc 1,

và trong đó,

tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-5$ là 80-95% tổng trọng lượng chế phẩm, và

tỷ lệ tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ với tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 4-7$ là trong phạm vi từ 1,0 đến 3,5.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất dược phẩm hoặc sản phẩm bảo vệ sức khỏe bao gồm chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế và, nếu cần, bao gồm cả chất mang thích hợp.

Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế được điều chế bằng phương pháp khác với phương pháp đang có trong lĩnh vực này. Phương pháp điều chế

này có ưu điểm của phản ứng đơn giản, hàm lượng thành phần hoạt tính cao, và không có chất phản ứng dư. Đã được chứng minh bằng thử nghiệm là chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế có thể ức chế sự tổn thương tế bào, bảo vệ tế bào thần kinh, và tăng tỷ lệ sống sót của tế bào. Trong mẫu động vật, chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế có thể cải thiện đáng kể chức năng học và nhận thức của chuột mất trí nhớ. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế có hiệu quả tiềm năng trong phòng trừ và điều trị bệnh Alzheimer.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện khối phổ của disacarit, trisacarit và tetrasacarit trong sản phẩm A.

Fig. 2 thể hiện khối phổ của pentasacarit, hexasacarit và heptasacarit trong sản phẩm A.

Fig. 3 thể hiện khối phổ của octasacarit, nonasacarit và decasacarit trong sản phẩm A.

Fig. 4 thể hiện hiệu quả bảo vệ của sản phẩm A ở các nồng độ khác nhau lên sự tổn hại tế bào thần kinh cảm ứng A β .

Fig. 5 thể hiện hiệu quả bảo vệ của axit oligomannaric có độ polyme hóa duy nhất đối với sự tổn hại tế bào thần kinh cảm ứng A β .

Fig. 6 thể hiện đánh giá hiệu quả từ disacarit đến decasacarit lên mẫu động vật của AD.

Fig. 7 thể hiện hiệu quả của chế phẩm oligosacarit và hexasacarit lên số lần động vật AD đi qua bậc.

Fig. 8 thể hiện hiệu quả của chế phẩm oligosacarit và hexasacarit lên khoảng cách bơi của động vật AD.

Fig. 9 thể hiện hoạt tính từ disacarit đến decasacarit và chế phẩm A lên mẫu đồng nuôi cấy tế bào.

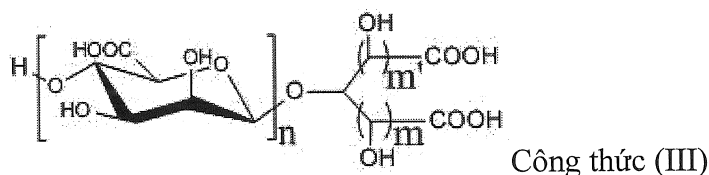
Mô tả chi tiết sáng chế

Nhiều khía cạnh khác nhau theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án cụ thể này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra một vài cải biến và điều chỉnh cho sáng chế

theo quan điểm bộc lộ cơ bản dưới đây và những cải biến đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic

Khía cạnh thứ nhất theo sáng chế đề xuất chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic, bao gồm điaxit mannuronic có công thức (III) hoặc muối được dụng của nó:



trong đó n là số nguyên từ 1 đến 9, m là 0, 1 hoặc 2, và m' là 0 hoặc 1,

và trong đó,

tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-5$ là 80-95% tổng trọng lượng của chế phẩm, và tỷ lệ của tổng trọng lượng điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ với tổng trọng lượng điaxit mannuronic trong đó $n = 4-7$ là trong phạm vi từ 1,0 đến 3,5.

Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế là hỗn hợp của điaxit mannuronic có các độ polyme hóa khác nhau, và các thành phần chính của nó là oligosacarit của điaxit mannuronic có độ polyme hóa từ 2 đến 10. Theo các ứng dụng trước, các sacarit có hoạt tính nhất trong điaxit mannuronic là từ pentasacarit đến octasacarit, đặc biệt là hexasacarit. Tuy nhiên, không giống với các giải pháp kỹ thuật đã có, tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc bổ sung disacarit đến tetrasacarit có hoạt tính thấp vào pentasacarit đến octasacarit có hoạt tính nhất thu được hoạt tính sinh học tốt hơn so với pentasacarit đến octasacarit, trong điều kiện pha loãng nồng độ của sacarit có hoạt tính cao.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 1$ hoặc 2 không thấp hơn 50% hoặc hơn, tốt hơn là, 60-90%, tốt hơn là, 70-90% tổng trọng lượng chế phẩm. Cụ thể là, trong chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 1$ không thấp hơn 10%, tốt hơn là, 30-40% tổng trọng lượng chế phẩm. Theo phương án được ưu tiên

khác, trong chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 2$ không thấp hơn 10%, tốt hơn là, 30-50% tổng trọng lượng của chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, tổng trọng lượng oligosacarit của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-5$ chiếm 80-95% tổng trọng lượng chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, tổng trọng lượng oligosacarit của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ chiếm 20-70% tổng trọng lượng chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, tỷ lệ tổng trọng lượng điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ với tổng trọng lượng oligosacarit của điaxit mannuronic trong đó $n = 4-7$ là trong phạm vi từ 1,0 đến 3,5, tốt hơn là, trong phạm vi từ 1,0 đến 3,0.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, tỷ lệ phần trăm trọng lượng của oligosacarit của điaxit mannuronic với các độ polyme hóa khác nhau trong chế phẩm là: 5-25% disacarit, 15-30% trisacarit, 15-25% tetrasacarit, 10-25% pentasacarit, 5-15% hexasacarit, 3-10% heptasacarit, 2-5% octasacarit, 1-5% nonasacarit, và 1-5% decasacarit. Cụ thể là, tỷ lệ phần trăm trọng lượng oligosacarit trong chế phẩm là: 10-20% disacarit, 18-30% trisacarit, 15-25% tetrasacarit, 15-20% pentasacarit, 5-10% hexasacarit, 3-5% heptasacarit, 2-3% octasacarit, 1-3% nonasacarit, và 1-3% decasacarit.

Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế, muối được dùng là muối natri hoặc muối kali.

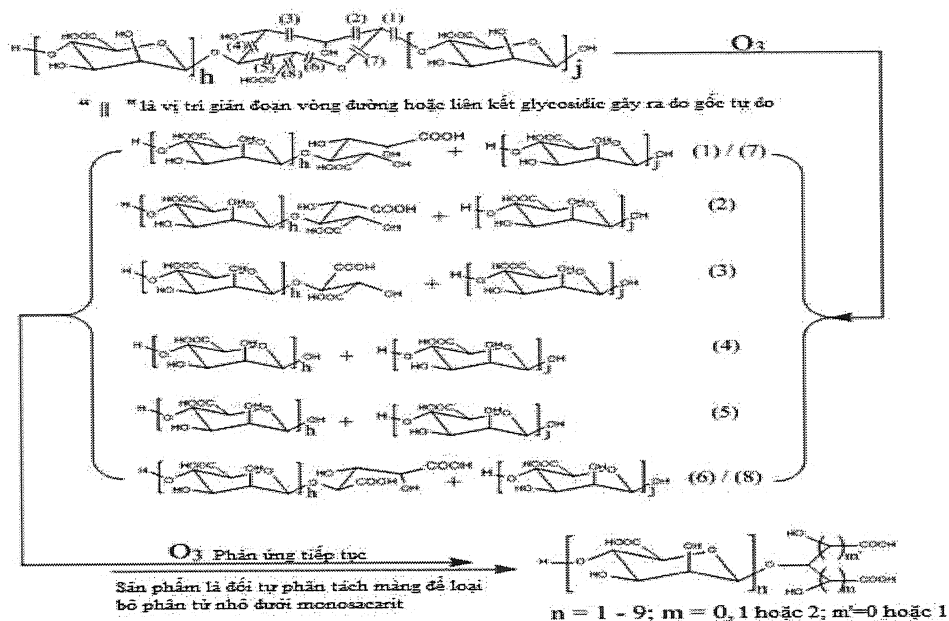
Phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic

Quy trình điều chế điaxit mannuronic theo sáng chế được tóm tắt như sau.

Chất trung gian phân đoạn M như mô tả ở trên được làm giảm tính oxy hóa trên mạch đường khi có mặt chất oxy hóa để tạo ra oligosacarit được oxy hóa có các độ polyme hóa khác nhau. Oligosacarit đã oxy hóa đặc trưng ở chỗ axit mannuronic ở đuôi khử của oligosacarit được oxy hóa thành axit sacarinic có 3-6 nguyên tử cacbon.

Chất oxy hóa mà đặc biệt có lợi cho phản ứng theo sáng chế là ozon. Trong khi xảy ra phản ứng, phản ứng làm giảm tính oxy hóa của mạch đường xuất hiện khi ozon được đưa vào dung dịch chứa chất trung gian phân đoạn M. Nhiệt độ mà tại đó bước thoái biến oxy hóa được tiến hành tốt hơn là, 0-70 °C, tốt hơn là, 10-45 °C. Độ pH mà tại đó bước thoái biến oxy hóa như được mô tả ở trên được tiến hành là 3-13, tốt hơn là, 4-10, tốt hơn là, 6-8.

Phản ứng thoái biến oxy hóa sử dụng ozon theo sáng chế và sự thoái biến oxy hóa sử dụng đồng sulfat kiềm (các sáng chế trước) hoặc thủy phân axit khi có mặt hydro peroxit và natri hypochlorua (Chinese Patent Application No. 01107952.5) trong các giải pháp kỹ thuật đã có, tất cả đều gây ra sự thoái biến đường, mà cấu trúc ở đuôi khử của chuỗi đường của các sản phẩm thoái biến khác nhau: sản phẩm thoái biến oxy hóa thu được trong sáng chế, điaxit mannuronic, có cấu trúc điaxit có 3-6 nguyên tử cacbon ở đuôi khử. Ngoài ra, quy trình được sử dụng trong bước thoái biến oxy hóa theo sáng chế có thể tạo ra các ưu điểm khác nhau: 1) điều kiện phản ứng nhẹ nhàng, và không yêu cầu điều kiện phản ứng đặc biệt nào; 2) ozon được sử dụng có thể được điều chế tại chỗ, và do đó giảm áp lực vận chuyển trong sản xuất công nghiệp; và 3) sau phản ứng, ozon tự động phân hủy được thành oxy, và do đó không có hại gây ra do chất phản ứng còn dư hoặc ô nhiễm môi trường. Quy trình phản ứng được thể hiện trong phương trình sau (IV):



Trong sơ đồ của phương trình phản ứng trên (IV) và hợp chất có công thức (III), oligosacarit trong đó $m=2$ và $m'=1$ là axit sacarinic bao gồm 6 nguyên tử cacbon;

oligosacarit trong đó $m = 1$ và $m' = 1$ hoặc ($m = 2$ và $m' = 0$) là axit sacarinic bao gồm 5 nguyên tử cacbon;

oligosacarit trong đó $m = 1$ và $m' = 0$ hoặc ($m = 0$ và $m' = 1$) là axit sacarinic bao gồm 4 nguyên tử cacbon; và

oligosacarit trong đó $m = 0$ và $m' = 0$ là axit sacarinic bao gồm 3 nguyên tử cacbon.

Sản phẩm phản ứng trên được khử muối bằng phân tách màng để thu được sản phẩm A, khi được xác định bằng kiểm tra cấu trúc LC-MS và đo tỷ lệ oligosacarit. Tỷ lệ oligosacarit được xác định bằng sắc ký loại trừ rây phân tử kết hợp với đo tán xạ laze đa góc. Sau đó, sản phẩm A được tách bằng sắc ký cột để điều chế oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất: từ disacarit đến decasacarit. Các oligosacarit này có độ polyme hóa duy nhất được so sánh về hoạt tính sinh học *in vitro* và *in vivo*. Đã phát hiện ra rằng hexasacarit có hoạt tính tốt nhất trong số 9 oligosacarit, điều này tương tự với kết quả của các sáng chế trước, ví dụ kết quả về hoạt tính của oligosacarit được bộc lộ trong tài liệu đơn sáng chế tình trạng kỹ thuật 1.

Các tác giả của sáng chế đã phát hiện ra rằng khi 9 oligosacarit trên có cấu trúc mới được tạo hợp chất với tỷ lệ nhất định, chế phẩm oligosacarit hoạt tính cao có hoạt tính cao hơn so với hexasacarit có hoạt tính cao nhất có thể thu được. Tỷ lệ phần trăm của các oligosacarit khác nhau trong chế phẩm oligosacarit có hoạt tính cao cần được kết hợp theo mối quan hệ về tỷ lệ sau:

Tổng trọng lượng oligosacarit của điaxit mannuronic trong đó $n=1-5$ trong chế phẩm là 80-95% tổng trọng lượng chế phẩm, và tổng trọng lượng oligosacarit của điaxit mannuronic trong đó $n=1-3$ là 20-70% tổng trọng lượng chế phẩm. Tỷ lệ tổng trọng lượng oligosacarit của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ với tổng trọng lượng oligosacarit của điaxit mannuronic trong đó $n = 4-7$ là trong phạm vi từ 1,0 đến 3,5, tốt hơn là, trong phạm vi từ 1,0 đến 3,0.

Sáng chế đề xuất công thức điều chế chế phẩm oligosacarit của axit oligomannarinic hoạt tính cao.

Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo sáng chế có thể ức chế sự tổn thương tế bào và bảo vệ tế bào thần kinh. Trong mẫu động vật, chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic được đề xuất bởi sáng chế có thể cải thiện đáng kể chức năng học và nhận biết của động vật mắc chứng mất trí. Do đó, chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic được đề xuất bởi sáng chế có hiệu quả tiềm năng trong phòng trừ và điều trị bệnh Alzheimer.

Theo phương án điển hình, phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước sau:

(1) Điều chế sản phẩm điaxit mannuronic:

Điều chế chất trung gian phân đoạn M. Như được mô tả ở trên, chất trung gian phân đoạn M là nguyên liệu khởi đầu được sử dụng trong sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, các phương pháp bộc lộ trong đơn sáng chế Trung Quốc số 98806637.8 và CN02823707.2. Phương pháp chung có thể được mô tả đơn giản như sau: axit alginic được làm thoái biến sơ bộ để thu được hỗn hợp polysacarit của axit polymannuronic và axit polyguluronic; hỗn hợp polysacarit này là đối tượng kết tủa axit để loại bỏ axit polyguluronic ở đây; và sau đó tinh chế được tiến hành để thu được axit homopolymannuronic có độ tinh khiết 90% hoặc hơn, tức là, chất trung gian phân đoạn M.

Thoái biến oxy hóa bằng ozon. Chất trung gian phân đoạn M được hòa tan trong lượng nước thích hợp và khuấy ở nhiệt độ trong phòng hoặc đun nóng. Nạp liên tục ozon để khởi đầu phản ứng. Độ pH của phản ứng có thể được điều chỉnh tới 3-13, tốt hơn là, 4-10, tốt hơn là, 6-8 bằng cách bổ sung nhỏ giọt dung dịch axit clohydric loãng hoặc NaOH loãng. Nhiệt độ tốt hơn là, 0-70 °C, tốt hơn là, 10-45 °C. Sau khi hoàn thành phản ứng, dừng việc nạp ozon và điều chỉnh độ pH tới trung tính.

Phân tách màng và tinh chế. Sản phẩm phản ứng thu được ở trên được điều chế thành dung dịch có nồng độ khoảng 10%, và được phân tách bằng màng cắt phân tử để loại bỏ sản phẩm thoái biến thấp hơn monosacarit, và thu phần được giữ lại. Màng cắt phân tử được sử dụng có MWCO là 1000-3000 Da, tốt hơn là, 2000 Da. Cô đặc chất lỏng thu được trên máy làm bay hơi quay và làm khô trong chân không để thu được hỗn hợp oligođiaxit mannuronic. Các sản phẩm này được phát hiện là chế phẩm bao gồm oligosacarit, tức là, từ disacarit đến decasacarit, với hàm lượng trong các phạm vi

nhất định. Ba chế phẩm, A, B và C, được điều chế theo phương pháp nêu trên. Tỷ lệ và cấu trúc của oligosacarit trong các chế phẩm này được xác nhận trong các ví dụ 1-3.

(2) Điều chế oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất

Hỗn hợp oligosacarit thu được trong bước (1) được hòa tan tới nồng độ khoảng 10%, được tách ra trên cột sắc ký gel P6, và là đối tượng để phát hiện tia cực tím để thu thập từng thành phần chảy ra. Các thành phần có độ polyme hóa giống nhau được kết hợp lại. Thu chín thành phần từ disacarit đến decasacarit, khử muối bằng sắc ký cột quá gel G10, cô đặc trên máy làm bay hơi quay, và làm khô trong chân không. Quy trình tinh chế và điều chế đặc biệt được thể hiện trong ví dụ 4. Các thao tác của sắc ký cột, khử muối và làm khô đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

9 oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất được đánh giá về hoạt tính được lý trong mẫu động vật mắc chứng lú lẫn. Đã phát hiện ra rằng hexasacarit có hoạt tính tốt nhất. Xem chi tiết trong ví dụ 4.

(3) So sánh hoạt tính của các chế phẩm oligosacarit

Oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất như được điều chế trong bước (2) trên được tạo hợp chất với tỷ khối như được thể hiện trong bảng dưới để thu được chế phẩm thứ 4, tức là chế phẩm D. Tỷ lệ oligosacarit trong ba chế phẩm oligosacarit A, B và C từ bước (1) trên và chế phẩm D được thể hiện trong bảng sau:

	disacarit	trisacarit	tetrasacarit	pentasacarit	hexasacarit	heptasacarit	octasacarit	nonasacarit	decasacarit
A	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
B	24%	25%	19%	12%	9%	5%	3%	2%	1%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	5%	30%	20%	20%	5%	5%	5%	5%	5%

Bốn chế phẩm trên và hexasacarit được tinh chế trong bước (2) được so sánh về hoạt tính được lý. Các kết quả thể hiện rằng bốn chế phẩm oligosacarit A, B, C và D nhiều hoạt tính hơn đáng kể so với hexasacarit mà có hoạt tính tốt nhất trong các oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất. Có thể thấy rằng oligosacarit duy nhất có thể đóng vai trò có hiệu quả hiệp đồng sau khi được tạo hợp chất. Sau khi được tạo hợp

chất, các oligosacarit có hoạt tính yếu, như disacarit và trisacarit, có hoạt tính cao hơn so với hexasacarit.

Tóm lại, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic có hoạt tính cao, bao gồm phản ứng thoái biến oxy hóa sử dụng chất trung gian phân đoạn M làm nguyên liệu thô khi có mặt ozon, và phân tách và tinh chế sản phẩm phản ứng bằng màng siêu lọc. Quy trình điều chế bao gồm quy trình sản xuất đơn giản và năng suất cao, và sản phẩm phản ứng có thể dễ dàng tinh chế để thu được sản phẩm có hoạt tính tốt. Các tác giả cũng phát hiện ra phạm vi tỷ lệ khối lượng và tỷ lệ của các oligosacarit khác nhau trong chế phẩm có hoạt tính cao. Tầm quan trọng của quy trình điều chế được đề xuất bởi sáng chế nằm ở chỗ thu được điaxit mannuronic có cấu trúc mới, tức là gốc điaxit có 6 cấu trúc khả thi ở đuôi khử của mạch đường, và chế phẩm oligosacarit được điều chế chứa tỷ lệ vừa phải của các oligosacarit khác nhau và có hoạt tính sinh học mạnh.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm hoặc sản phẩm bảo vệ sức khỏe bao gồm chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic như được mô tả ở trên, và tùy ý chất mang hoặc tá dược được dụng.

Phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit chứa thành phần hoạt tính với các tỷ lệ khác nhau được biết, hoặc đã rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này từ phần mô tả theo sáng chế, ví dụ, như được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995). Các phương pháp bào chế được phẩm bao gồm kết hợp tá dược, chất mang, chất pha loãng được dụng và chất tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế được điều chế bằng phương pháp đã biết, bao gồm trộn, hòa tan hoặc đông khô thông thường.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân thông qua nhiều đường thích hợp đối với dạng sử dụng lựa chọn, như dùng qua đường miệng hoặc tiêm (thông qua đường tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tại chỗ hoặc tiêm dưới da).

Theo đó, dược phẩm kết hợp theo sáng chế có thể được dùng theo hệ thống, ví dụ, theo đường miệng, kết hợp với chất mang được dụng như chất pha loãng trợ hoặc chất mang ăn được. Có thể được bao trong viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, hoặc có thể được nén thành viên nén. Đối với dùng điều trị theo đường miệng, hợp chất hoạt

tính theo sáng chế có thể được kết hợp với một hoặc nhiều tá dược và được sử dụng ở dạng viên nén có thể nuốt được, viên nén, viên ngậm trong miệng, viên ngậm, viên nang, dịch chiết, huyền phù, sirô, viên xộp, và tương tự. Hỗn hợp và chế phẩm chứa ít nhất 0,1% hợp chất hoạt tính. Tỷ lệ của hỗn hợp và chế phẩm có thể là, tất nhiên là, khác nhau và có thể trong phạm vi từ khoảng 1% đến khoảng 99% theo trọng lượng của dạng liều đơn vị thu được. Lượng hợp chất hoạt tính trong chế phẩm hữu ích điều trị này là lượng liều có hiệu quả có thể thu được.

Viên nén dài, viên ngậm, viên nén tròn, viên nang và tương tự có thể còn chứa: chất dính như nhựa tragacan, nhựa cây keo, tinh bột ngô hoặc gelatin; tá dược như dicanxi phosphat; chất làm tan rã như tinh bột ngô, tinh bột khoai tây, axit alginic và tương tự; chất bôi trơn như magie stearat; và chất tạo ngọt như sucroza, fructoza, lactoza hoặc aspartam; hoặc chất tạo hương vị như bạc hà, dầu cây lộc đề, hoặc dầu anh đào. Khi dạng liều đơn vị là viên nang, nó có thể chứa, ngoài vật liệu loại nêu trên, là chất mang lỏng như dầu thực vật hoặc polyetylen glycol. Nhiều vật liệu khác có thể có mặt dưới dạng lớp phủ hoặc theo cách khác cải biến dạng vật lý của liều đơn vị rắn. Ví dụ, viên nén, viên nén tròn, hoặc viên nang có thể được phủ bằng gelatin, sáp, senlac, hoặc đường. Sirô hoặc dịch chiết có thể chứa hợp chất hoạt tính, sucroza hoặc fructoza làm chất tạo ngọt, metylparaben hoặc propylparaben làm chất bảo quản, chất tạo màu hoặc chất tạo hương vị như hương anh đào hoặc cam. Tất nhiên, vật liệu bất kỳ được sử dụng để điều chế dạng liều đơn vị bất kỳ nên là được dụng và không độc với lượng được dùng. Ngoài ra, hợp chất hoạt tính có thể được kết hợp vào chế phẩm giải phóng duy trì và thiết bị giải phóng duy trì.

Hợp chất có hoạt tính có thể cũng được dùng cho tĩnh mạch hoặc màng bụng bằng cách truyền hoặc tiêm. Dung dịch của hoạt chất hoặc muối của nó có thể được điều chế trong nước, tùy ý trộn với chất bề mặt không độc. Các chất phân tan cũng có thể được điều chế trong glyxerol, polyetylen glycol lỏng, triaxetin, và hỗn hợp của nó và trong dầu. Trong điều kiện bảo quản và sử dụng thông thường, chất phẩm này chứa chất bảo quản để ngăn sự sinh trưởng của vi sinh vật.

Các dạng liều được dụng thích hợp để tiêm hoặc truyền có thể chứa dung dịch nước vô trùng hoặc chất phân tán hoặc bột vô trùng của thành phần hoạt tính (tùy ý được bọc kín trong liposom) có trong chế phẩm dùng ngay tức thì của dung dịch vô trùng hoặc chất phân tán thích hợp để tiêm hoặc truyền. Trong tất cả các trường hợp,

dạng liều lượng cuối phải vô trùng, lỏng và ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản. Chất mang lỏng có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán lỏng bao gồm, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol lỏng, và chất tương tự), dầu thực vật, glyxerit không độc, và hỗn hợp thích hợp của nó. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ bằng cách tạo liposom, bằng cách duy trì kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp phân tán, hoặc bằng cách sử dụng chất bề mặt. Hoạt động kháng vi sinh vật có thể được đem lại bằng nhiều chất kháng khuẩn và kháng nấm, ví dụ, paraben, clorobutanol, phenol, axit sorbic, thimerosal, và chất tương tự. Trong nhiều trường hợp, sẽ ưu tiên bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, đệm hoặc muối clorua. Sự hấp thụ kéo dài của chế phẩm tiêm được có thể được đem lại bằng cách sử dụng chất làm chậm sự hấp thụ, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin.

Dung dịch có thể tiêm được vô trùng được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính với lượng yêu cầu trong dung môi thích hợp có nhiều thành phần khác được liệt kê ở trên, khi cần thiết, sau đó là lọc vô trùng. Trong trường hợp bột vô trùng dùng cho dung dịch có thể tiêm được vô trùng, phương pháp được ưu tiên để điều chế là làm khô trong chân không và kỹ thuật đông khô mà thu được bột thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch lọc vô trùng trước đó của chúng.

Chất mang rắn hữu ích bao gồm chất rắn nghiền thành bột (ví dụ, đá tan, đất sét, xeluloza vi tinh thể, silic, nhôm, v.v.). Chất mang lỏng hữu ích bao gồm nước, etanol, etylen glycol hoặc hỗn hợp etanol/etylen glycol-nước. Dược phẩm theo sáng chế có thể được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang với lượng có hiệu quả, tùy ý phụ gia là chất bề mặt không độc. Tá dược (như chất tạo mùi) và chất kháng khuẩn bổ sung có thể được bổ sung để tối ưu hóa đặc tính sử dụng nhất định.

Chất làm đặc (như polyme tổng hợp, axit béo, muối của axit béo và este, rượu béo, xenluloza cải biến hoặc vật liệu vô cơ cải biến) cũng có thể được sử dụng với chất mang lỏng để tạo ra bột nhão, gel, thuốc mỡ, xà phòng, v.v. mà có thể được dùng trực tiếp cho da người dùng.

Lượng hợp chất cần thiết để điều trị hoặc hỗn hợp của nó phụ thuộc không chỉ vào chính hợp chất, mà còn vào dạng sử dụng, bản chất của bệnh được điều trị, và tuổi

và tình trạng bệnh nhân, cuối cùng phụ thuộc vào quyết định của bác sỹ hoặc bác sỹ lâm sàng.

Chế phẩm trên có thể được thể hiện ở dạng liều đơn vị, mà là đơn vị vật lý riêng chứa liều đơn vị, và thích hợp để dùng cho người và cơ thể động vật có vú khác. Dạng liều đơn vị có thể là viên nang hoặc viên nén, hoặc nhiều viên nang hoặc viên nén. Lượng liều đơn vị thành phần hoạt tính có thể khác nhau và được điều chỉnh trong khoảng từ 0,1 đến 1000 mg hoặc hơn, phụ thuộc vào điều trị cụ thể liên quan.

Mẫu động vật và bước đánh giá hiệu quả và hoạt tính

1. Mẫu động vật để đánh giá hiệu quả chống lại AD: mẫu AD được gây ra bằng cách tiêm A β vào một bên não thất, và hành vi học và ghi nhớ của chuột mẫu AD được đánh giá bằng thử nghiệm mê cung nước Morris.

Chuột Wistar đực được sử dụng, mỗi con chuột có trọng lượng từ 180 đến 220 g. Ngẫu nhiên: nhóm đối chứng giả hoạt động, nhóm mẫu và nhóm liều lượng, 14 động vật mỗi nhóm. Chuột được gây mê bằng cách tiêm màng bụng natri pentobarbital (40 mg/kg) và gắn vào thiết bị cố định. Da được chuẩn bị thường xuyên, vô trùng, cắt và lộ ra thóp trước. Vùng CA1 hồi cá ngựa được đặt ở vị trí “3,0 mm sau thóp trước, 2,2 mm cạnh raphe, và 2,8 mm dưới màng cứng” như được mô tả trong Stereotaxic Map of Rat Brain, Xinming Bao and Siyun Shu, Beijing, People's Medical Publishing House, 1991, 28. Đối với nhóm mẫu và nhóm liều lượng, 5 μ L A β kết tụ (A β 1-40 được pha chế trong dung dịch PBS đến nồng độ 1,4 mg/mL, và được ủ trong máy ủ ở 37 °C trong 5 ngày để tạo ra trạng thái kết tụ) được tiêm chậm vào vùng CA1 hồi cá ngựa phải bằng vi tiêm dọc vào sọ, với lưu lượng 1 μ L/phút. Sau khi hoàn thành tiêm, kim được để lại trong 5 phút, sao cho A β có thể được phân tán đủ. Sau đó, kim được rút ra chậm. Vết mổ được khâu và giữ ấm để phục hồi. Nhóm đối chứng nhận quy trình tương tự ngoại trừ việc lượng tiêm PBS vô trùng bằng nhau. Dược chất tương ứng được dùng 7 ngày trước khi thực hiện, và việc dùng được tiếp tục đến cuối thử nghiệm.

Thử nghiệm mê cung nước Morris được thực hiện vào ngày 11 sau khi thực hiện thử nghiệm.

Thử nghiệm điều hướng: Mỗi nhóm chuột được huấn luyện một lần một ngày trong 5 ngày liên tiếp, tức là, nhận thử nghiệm điều hướng. Thời gian động vật tìm bực (tức là, thời gian chờ thoát) được ghi lại. Chuột không tìm thấy bực trong khoảng 90

giây được huấn luyện bơi tới bục theo hướng đường thẳng và đứng trên bục trong 30 giây, để học tập và tạo ghi nhớ.

Thử nghiệm thăm dò không gian: vào ngày thứ hai sau khi kết thúc thử nghiệm điều hướng, bục được loại bỏ, và chuột được đặt vào nước từ nơi vào. Số lần động vật đi qua bục và phần trăm của khoảng cách bơi trong một phần tư đường tròn nơi mà đặt bục so với tổng khoảng cách được ghi lại. Chức năng học và ghi nhớ của động vật được đánh giá.

2. Mẫu để đánh giá khả năng sống của tế bào: các tế bào SH-SY5Y (tế bào u nguyên bào thần kinh) được nhân lên trong khay 96 lỗ (3000 tế bào/lỗ). Sau 24 giờ, loại bỏ môi trường và bổ sung được chất để xử lý trước trong 0,5 giờ (được điều chế trong môi trường nuôi cấy không huyết thanh; 3 lần lặp lại mỗi liều). Sau đó, A β 1-42 kết tụ (A β 1-42 được điều chế trong dung dịch PBS thành nồng độ 1 mg/mL, và được ủ trong máy ủ ở 4 °C trong 24 giờ để tạo ra trạng thái kết tụ, ở nồng độ cuối cùng 2 μ M) được bổ sung và ủ trong 48 giờ. Khả năng sống sót của tế bào được phát hiện bằng CCK8.

Ưu điểm của sáng chế còn được minh họa trong các ví dụ không hạn chế sau. Tuy nhiên, vật liệu cụ thể và lượng của nó cũng như là điều kiện thử nghiệm khác được sử dụng trong các ví dụ không nên hiểu là giới hạn sáng chế. Tất cả các phần, tỷ lệ, phần trăm hoặc tương tự trong sáng chế được thể hiện bằng khối lượng trừ khi có trường hợp cụ thể khác được chỉ ra.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1:

Bước 1): Điều chế oligosacarit của hỗn hợp điaxit mannuronic

Chất trung gian phân đoạn M được điều chế bằng phương pháp bộc lộ trong các sáng chế đã có. Các hoạt động đặc biệt được mô tả đơn giản dưới đây: 5 Kg natri alginat được pha chế thành dung dịch ~10%, và điều chỉnh độ pH đến khoảng 3,0 bằng cách bổ sung axit clohydric loãng. Làm nóng dung dịch đến 80 °C, và khuấy. Phản ứng xảy ra trong 10 giờ trước khi dừng làm nóng. Sau khi làm mát tới nhiệt độ trong phòng, điều chỉnh độ pH đến 9,0 bằng cách bổ sung NaOH, và điều chỉnh tiếp đến 2,85 bằng cách bổ sung axit clohydric loãng. Ly tâm dung dịch ở 5000 vòng/phút

trong 10 phút. Thu huyền phù, và điều chỉnh độ pH đến 1,0 bằng cách bổ sung HCl. Sau khi ly tâm, thu kết tủa, cô đặc trên máy bay hơi quay, và làm khô trong chân không để thu được 1500 g chất trung gian phân đoạn M. Cân 500 g chất trung gian phân đoạn M, và hòa tan vào nước cất để điều chế dung dịch có thể tích 5 L. Điều chỉnh độ pH của dung dịch đến pH 6,5 bằng NaOH, và làm nóng trong bể nước để điều chỉnh nhiệt độ phản ứng tới 75 °C. Lưu lượng khí ở lối ra của bơm oxy và năng suất của máy tạo ozon được điều chỉnh sao cho ozon được nạp và dung dịch phản ứng ở lưu lượng tập trung khối lượng là 8 g/giờ. Sau 4 giờ phản ứng, dừng việc nạp ozon, và bổ sung lượng nước thích hợp để điều chỉnh nồng độ dung dịch tới khoảng 10%. Dung dịch được lọc thông qua màng siêu lọc với trọng lượng phân tử cắt 2.000 Da để thu phần còn lại trên màng. Chất lỏng thu được được cô đặc trên máy làm bay hơi quay và làm khô trong chân không để thu được 350 g sản phẩm điaxit mannuronic A.

Bước 2): Phân tích tỷ lệ và cấu trúc của oligosacarits có các độ polyme hóa khác nhau trong sản phẩm điaxit mannuronic A

100 mg sản phẩm điaxit mannuronic A được làm khô nêu trên được cân chính xác, hòa tan trong nước đến nồng độ 10 mg/mL, và đi qua màng lọc 0,22 um để thu được dung dịch mẫu thử nghiệm. Tỷ lệ của oligosacarit có độ polyme hóa khác nhau trong chế phẩm được xác định bằng sắc ký loại trừ phân tử peptit Superdex (GE Co.) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (MALS, Wyatt Co.). Điều kiện thử nghiệm như sau:

Sắc ký cột: Superdex peptit 10/300GI

Pha động: 0,1 mol/L NaCl

Thể tích tiêm: 10 µL

Lưu lượng: 0,3 mL/phút

Kết quả thử nghiệm: từ disacarit đến decasacarit được thể hiện lần lượt bằng dp2 - dp10. dp2 là 19%, dp3 là 25%, dp4 là 22%, dp5 là 13%, dp6 là 9%, dp7 là 6%, dp8 là 3%, dp9 là 2%, và dp10 là 1%.

Bước 3): Phân tích LC-MS cấu trúc oligosacarit có độ polyme hóa khác nhau trong sản phẩm điaxit mannuronic A

Điều kiện thử nghiệm:

Cột sắc ký: Superdex peptit 10/300G1

Pha động: 20% metanol + 80% 80 mmol/L NH_4Ac

Lưu lượng: 0,1 mL/phút

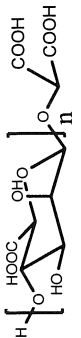
Nhiệt độ cột: $25 \pm 0,8$ °C.

Điều kiện khối phổ: Agilent 6540 QTOF; nguồn ion: điện áp xung ESI 120 V; chế độ ion âm. Độ rộng của tín hiệu thu được (m/z) là 100-1000.

Khối phổ oligosacarit có nhiều độ polyme hóa khác nhau được thể hiện trong Fig. 1-3. Các đỉnh tín hiệu khác nhau trong khối phổ được gán, xác nhận cấu trúc phân tử của tất cả oligosacarit trong sản phẩm A, tức là, cấu trúc như được thể hiện trong công thức (III). Sự gán tín hiệu và cấu trúc tương ứng cho các tín hiệu được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. 6 cấu trúc điaxit của oligosacarit có độ polyme hóa khác nhau trong sản phẩm A và tỷ lệ khối lượng với điện tích của chúng trong khối phổ

Tỷ lệ khối lượng-điện tích (m/z)											
Số	Cấu trúc phân tử	Công thức phân tử	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	n=8	n=9
			[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-1] ⁻	[M-2] ²⁻	[M-2] ²⁻	[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		$(C_6H_8O_6)_n C_3H_4O_5$ $n=1-9$	295	471	647	823	999	1175	675	763	851
---	---	--------------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	------	-----	-----	-----

Đã phát hiện từ phân tích cấu trúc khối phổ trên là axit mannuronic ở đuôi khử của chuỗi đường trong sản phẩm A được oxy hóa thành cấu trúc axit sacaric (xem công thức III), mà có thể là cấu trúc mannaric bao gồm 6 nguyên tử cacbon ($m+m'=3$), có hàm lượng khoảng 10-30%, hoặc sản phẩm khử cacboxyl hóa của axit mannaric, tức là, axit sacaric bao gồm 5 nguyên tử cacbon ($m+m'=2$) (30-50%) và axit sacaric bao gồm 4 nguyên tử cacbon ($m+m'=1$) (30-40%).

Bước 4) Đánh giá hoạt tính dược lý

1. Hiệu quả bảo vệ của sản phẩm A lên tổn thương tế bào thần kinh do A β

Thử nghiệm được tiến hành theo "mẫu đánh giá khả năng sống sót của tế bào", và quy trình thử nghiệm như sau: tế bào SH-SY5Y (tế bào u nguyên bào thần kinh) được nhân lên trong khay 96 lỗ (3000 tế bào/lỗ). Sau 24 giờ, loại bỏ môi trường, và đối với nhóm liều lượng, 10 μ L được chất (10 mg/mL) mỗi giếng được bổ sung vào để xử lý trước trong 0,5 giờ (điều chế trong môi trường nuôi cấy không huyết thanh; 3 lần lặp lại mỗi liều). Sau đó A β 1-42 kết tụ (A β 1-42 được điều chế trong dung dịch PBS đun nồng độ 1 mg/mL, và được ủ trong máy ủ ở 4 °C trong 24 giờ để tạo ra trạng thái kết tụ, ở nồng độ cuối cùng 2 μ M) được bổ sung và được ủ trong 48 giờ. Khả năng sống sót của tế bào được phát hiện bằng CCK8.

Các kết quả đã thể hiện rằng xử lý tế bào SH-SY5Y bằng A β 1-42 2 μ M có thể gây ra tổn thương tế bào đáng kể và làm giảm khả năng sống sót của tế bào sau 48 giờ, trong khi đó sản phẩm A nồng độ 25, 50 và 100 μ g/mL có thể ức chế đáng kể sự giảm khả năng sống sót của tế bào do A β ; xem Fig. 4. Kết quả trên chỉ ra rằng sản phẩm A có thể bảo vệ tế bào thần kinh khỏi tác động gây gộc của A β ở nồng độ thấp (25 μ g/mL), nồng độ trung bình (50 μ g/mL), và nồng độ cao (100 μ g/mL).

Ví dụ 2:

Cân 100 g chất trung gian phân đoạn M từ ví dụ 1, và hòa tan trong nước cất để điều chế dung dịch có thể tích 0,8 L. Điều chỉnh độ pH của dung dịch tới 4,0 bằng NaOH, và tiến hành phản ứng ở nhiệt độ trong phòng (25 °C). Lưu lượng khí ở lối ra của bơm oxy và năng suất của máy tạo ozon được điều chỉnh sao cho ozon được nạp vào dung dịch phản ứng ở lưu lượng tập trung khối lượng là 1 g/giờ. Sau 10 giờ phản ứng, dừng nạp ozon, và bổ sung lượng thích hợp nước vào để điều chỉnh nồng độ của

dung dịch thành khoảng 15%. Lọc dung dịch qua màng siêu lọc với trọng lượng phân tử loại bỏ là 1.000 để thu được phần lưu lại trên màng. Cô đặc chất lỏng thu được trên máy bay hơi quay và làm khô trong chân không để thu được 80 g sản phẩm điaxit mannuronic B.

Tỷ lệ của oligosacarits có các độ polyme hóa khác nhau trong B được xác định bằng sắc ký lọc phân tử dùng peptit Superdex (GE Co.) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (multi-angle laser light scattering-MALS, Wyatt Co.). Phương pháp đo giống với ví dụ 1. Kết quả thử nghiệm: từ disacarit đến decasacarit được thể hiện lần lượt bằng dp2 - dp10, dp2 là 24%, dp3 là 25%, dp4 là 19%, dp5 là 12%, dp6 là 9%, dp7 là 5%, dp8 là 3%, dp9 là 2%, và dp10 là 1%.

Ví dụ 3:

Cân 100 g chất trung gian phân đoạn M của ví dụ 1, và hòa tan vào nước cất để điều chế dung dịch có thể tích 1,5 L. Điều chỉnh độ pH của dung dịch tới 9,0 bằng NaOH, và tiến hành phản ứng trong bể nước ở 45 °C. Lưu lượng khí ở lối ra của bom oxy và năng suất của máy tạo ozon được điều chỉnh sao cho ozon được nạp vào dung dịch phản ứng ở lưu lượng tập trung khối lượng 3 g/giờ. Sau 2 giờ phản ứng, dừng nạp ozon, và bổ sung lượng nước thích hợp vào để điều chỉnh nồng độ của dung dịch thành khoảng 5%. Lọc dung dịch thông qua màng siêu lọc với trọng lượng phân tử loại bỏ là 3.000 Da để thu phần còn lại trên màng. Cô đặc chất lỏng thu được trên máy bay hơi quay và làm khô trong chân không để thu được 60 g sản phẩm điaxit mannuronic C.

Tỷ lệ của oligosacarits có các độ polyme hóa khác nhau trong C được xác định bằng sắc ký lọc phân tử dùng peptit Superdex (GE Co.) kết hợp với tán xạ ánh sáng laze đa góc (multi-angle laser light scattering-MALS, Wyatt Co.). Phương pháp đo giống với ví dụ 1. Kết quả thử nghiệm: từ disacarit đến decasacarit được thể hiện lần lượt bằng dp2 - dp10. dp2 là 8%, dp3 là 20%, dp4 là 28%, dp5 là 19%, dp6 là 13%, dp7 là 6%, dp8 là 3%, dp9 là 2%, và dp10 là 1%.

Ví dụ 4:

Bước 1) Điều chế oligosacarit của điaxit mannuronic có độ polyme hóa duy nhất, như sau:

1. Điều chế mẫu: Hòa tan 300 g sản phẩm điaxit mannuronic A được điều chế trong ví dụ 1 trong nước để điều chế 1000 mL dung dịch cô đặc, mà được đặt trong tủ lạnh 4 °C để sử dụng. Mỗi lần sử dụng, pha loãng 50 mL dung dịch theo tỷ lệ 1:2 với nước, và sau đó lọc hút qua màng siêu lọc 0,22 μm .

2. Điều kiện phân tách sắc ký là hệ thống AKTA pure 150 (mua từ GE Co.) được trang bị máy dò UV và máy thu thập tự động. Cột sắc ký phân tách: 1,2 kg của BioGel P6 (mua từ Bio-Rad Co.) được trộn với nước khử ion, khử khí trong chân không, và nạp đầy bằng tay vào cột thủy tinh (đường kính bên trong: 10 cm), rửa bằng nước tinh khiết 10 lần thể tích cột. Lòng cột sắc ký ổn định và có chiều cao 1,0 m. Sau đó, pha động được thay đổi thành dung dịch NaCl 0,02 M, và sau khi làm cân bằng bằng 10 lần thể tích cột, bắt đầu nạp mẫu.

3. Nạp mẫu và phân tách: Lưu lượng dòng của bơm được thiết lập ở 1 mL/phút. Sau khi 100 mL dung dịch mẫu được bơm lên đỉnh của cột thông qua bơm của chính máy sắc ký, nó được chuyển thành pha động và rửa giải ở lưu lượng 5 mL/phút. Sau khi hết lượng nước chết, bắt đầu thu thập tự động và 50 mL được thu thập cho mỗi ống.

4. Lặp lại nạp mẫu, và sau 20 lần lặp lại điều chế, các phân đoạn giống nhau được kết hợp, cô đặc trên máy làm bay hơi quay, và đông khô để thu được tổng số 9 oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất từ disacarit đến decasacarit.

Bước 2) đánh giá hoạt tính dược lý

Hoạt tính dược lý của oligosacarit của axit oligomannaric có độ polyme hóa duy nhất được đánh giá như sau:

1. Hiệu quả bảo vệ oligosacarit lên tổn thương tế bào thần kinh do A β

Thử nghiệm được tiến hành theo cách giống với ví dụ 1, và dung dịch oligosacarit được điều chế ở nồng độ 10 mg/mL.

Các kết quả đã thể hiện rằng xử lý tế bào SH-SY5Y bằng A β 1-42 2 μM có thể gây tổn thương tế bào đáng kể và giảm khả năng sống sót của tế bào sau 48 giờ, trong khi đó tất cả oligosacarit của điaxit mannuronic có độ polyme hóa duy nhất có xu hướng ức chế tổn thương tế bào do A β . Oligosacarit của điaxit mannuronic có độ polyme hóa 4-10 (nồng độ cuối cùng của dược chất là 25 $\mu\text{g/mL}$) có thể bảo vệ đáng

kể tế bào thần kinh khởi tác động gây độc của A β , trong đó oligosacarit có bốn độ polyme hóa từ 5 đến 8 có hiệu quả tốt hơn, và hexasacarit có hoạt tính tốt nhất; xem Fig. 5.

2. Hiệu quả của oligosacarit lên mẫu suy giảm hoạt động học tập và ghi nhớ bằng tiêm A β 1-40 vào tĩnh mạch phải chuột

Quy trình thử nghiệm được tiến hành ở 10 g mỗi disacarit đến decasacarit theo phương pháp đối với "mẫu động vật để đánh giá hiệu quả chống lại AD".

Do số lượng lớn oligoaxit sacaric có độ polyme hóa đơn, thử nghiệm được hoàn thiện trong nhiều mẻ. So sánh và đánh giá hiệu quả của các oligosacarit khác nhau được tiến hành bằng cách đếm tỷ lệ số lần động vật trong mỗi nhóm đi qua bục so với số lần động vật đối chứng giả hoạt động đi qua bục. Kết quả đã thể hiện rằng số lượng đi qua bục giảm đáng kể trong nhóm mẫu khi so với nhóm đối chứng giả hoạt động. Mỗi oligosacarit có độ polyme hóa đơn có xu hướng tăng số lần đi qua bục. Oligosacarit của điaxit mannuronic có độ polyme hóa đơn từ 4 đến 10 tăng đáng kể số lần đi qua bục, trong đó oligosacarit có bốn độ polyme hóa từ 5 đến 8 có hiệu quả tốt hơn và hexasacarit có hoạt tính tốt nhất; xem Fig. 6.

Ví dụ 5

Đánh giá hoạt tính dược lý được tiến hành giữa các chế phẩm và hexasacarit để thẩm định hiệu quả hiệp đồng của các oligosacarit có độ polyme hóa khác nhau trong chế phẩm và phạm vi tỷ lệ của các oligosacarit.

Chuẩn bị mẫu: oligosacarit của điaxit mannuronic có độ polyme hóa duy nhất được điều chế trong ví dụ 4 được cân chính xác từ disacarit đến decasacarit theo độ polyme hóa. Trọng lượng của mỗi sacarit được sử dụng như sau: 0,5 g disacarit, 3,0 g trisacarit, 2,0 g tetrasacarit, 2,0 g pentasacarit, 0,5 g hexasacarit, 0,5 g heptasacarit, 0,5 g octasacarit, 0,5 g nonasacarit, và 0,5 g decasacarit. Chúng được trộn để thu được 10 g sản phẩm tổng hợp D.

Tỷ lệ của oligosacarit trong các sản phẩm A, B, và C lần lượt được điều chế trong các ví dụ 1, 2, và 3, và sản phẩm D được điều chế trong ví dụ hiện tại được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Tỷ lệ của oligosacarit trong chế phẩm oligosacarit của các sản phẩm điaxit mannuronic

Tỷ lệ Chế phẩm	disacarit	trisacarit	tetrasacarit	pentasacarit	hexasacarit	heptasacarit	octasacarit	nonasacarit	decasacarit
A	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
B	24%	25%	19%	12%	9%	5%	3%	2%	1%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	5%	30%	20%	20%	5%	5%	5%	5%	5%

10 g mỗi mẫu A, B, C, và D trên được sử dụng để so sánh hoạt tính được lý của các chế phẩm này và hexasacarit (6T) theo phương pháp được mô tả trong "mẫu động vật để đánh giá hiệu quả chống lại AD".

Trong thử nghiệm này, khi so sánh với nhóm đối chứng hoạt động giả, các động vật trong nhóm mẫu kéo dài đáng kể khoảng thời gian tìm kiếm bực, chỉ ra rằng việc tạo mẫu đánh giá thành công. Khi so sánh với nhóm mẫu, mỗi nhóm liều lượng rút ngắn đáng kể khoảng thời gian tìm kiếm bực.

Có một ngày nghỉ sau khi kết thúc huấn luyện điều hướng. Sau đó, loại bỏ bực và thử nghiệm dò không gian được tiến hành để quan sát số lần động vật đi qua bực và phần trăm khoảng cách bơi trong một phần tư đường tròn nơi mà bực ban đầu được đặt so với tổng số khoảng cách, và đánh giá chức năng ghi nhớ của động vật. Kết quả đã thể hiện rằng số lần đi qua bực giảm đáng kể trong nhóm mẫu và tăng đáng kể trong nhóm liều lượng khi so với nhóm đối chứng hoạt động giả, như được thể hiện trong Fig. 7. Tỷ lệ khoảng cách bơi trong góc một phần tư đường tròn nơi mà bực ban đầu được đặt so với tổng khoảng cách đã thể hiện xu hướng tương tự với số lần đi qua bực. Khi so sánh với nhóm đối chứng hoạt động giả, tỷ lệ khoảng cách bơi trong góc một phần tư đường tròn nơi mà bực ban đầu được đặt so với tổng khoảng cách đã giảm đáng kể trong nhóm mẫu, và tăng đáng kể trong nhóm liều lượng, như được thể hiện trong Fig. 8.

Các kết quả thử nghiệm đã thể hiện rằng hoạt tính được lý tương ứng của các chế phẩm oligosacarit A, B, C và D vẫn rất mạnh trong ngày 4, và mạnh hơn so với hoạt

tính của hexasacarit có độ polyme hóa duy nhất, đề xuất sự hiệp đồng giữa các oligosacarit trong chế phẩm.

Ví dụ 6

Công nghệ đồng nuôi cấy tế bào được sử dụng để đánh giá thêm hoạt tính của nhiều oligosacarit khác nhau có độ polyme hóa duy nhất và chế phẩm.

Lượng thích hợp oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất như được điều chế trong ví dụ 4 và sản phẩm chế phẩm oligosacarit A được điều chế trong ví dụ 1 được cân trọng lượng chính xác, và hòa tan trong PBS để điều chế dung dịch được chất thử nghiệm có nồng độ 10 mg/mL.

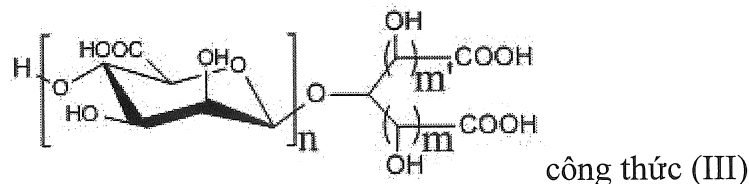
Thử nghiệm đồng nuôi cấy tế bào chủ yếu giống với phương pháp nuôi cấy tế bào trong ví dụ 1 và 4 nêu trên. Điểm khác nhau chính nằm ở chỗ công nghệ đồng nuôi cấy tế bào giả tương tác của các tế bào khác nhau *in vivo*. Cho rằng các tế bào *in vivo* có thể tương tác với nhau thông qua con đường tín hiệu, để gần hơn với môi trường *in vivo*, và mô phỏng sự tương tác giữa các tế bào khác nhau trong quá trình phát triển AD, các tế bào thần kinh đệm được đưa vào trong quá trình nuôi cấy. Quy trình thử nghiệm đặc trưng như sau: các tế bào SH-SY5Y (tế bào u nguyên bào thần kinh) được nhân lên trong khay 24 lỗ (12.000 tế bào/lỗ), và tế bào BV-2 (tế bào thần kinh đệm) được nhân lên trong buồng trên ở nồng độ 15.000 tế bào/lỗ. Sau 24 giờ, loại bỏ môi trường, và dung dịch được chất thử nghiệm được bổ sung vào buồng dưới để thu được nồng độ được chất cuối cùng là 25 μ g/mL. Sau 0,5 giờ xử lý (điều chế thành môi trường nuôi cấy không huyết thanh; 3 bản sau trên mỗi dung dịch), A β 1-42 kết tụ (A β 1-42 được điều chế trong dung dịch PBS đến 1 mg/mL, và được ủ trong máy ủ ở 4 °C trong 24 giờ để tạo ra trạng thái kết tụ, ở nồng độ 2 μ M) được bổ sung và ủ trong 48 giờ. Tỷ lệ sống sót của tế bào SH-SY5Y trong buồng dưới được phát hiện bằng CCK8.

Sau 48 giờ, nhóm mẫu được so sánh với nhóm đối chứng thường. Tổn thương cũ đáng kể được thể hiện và làm giảm tỷ lệ sống sót của tế bào. Nhóm liều lượng đã thể hiện hiệu quả ức chế tổn thương tế bào do A β . Cụ thể là, hoạt tính của sản phẩm A tốt hơn đáng kể so với hoạt tính của 9 oligosacarit khác có độ polyme hóa duy nhất, như được thể hiện trong Fig. 9. Mẫu tế bào đồng nuôi cấy có thể nhận ra sự khác nhau về hoạt tính giữa chế phẩm và các oligosacarit có độ polyme hóa duy nhất, là có thể bởi

vì hiệu quả hiệp đồng có thể xuất hiện giữa xytokin được giải phóng từ tế bào thân kinh đệm và oligosacarit có độ polyme hóa khác nhau trong chế phẩm, nhờ đó làm tăng hoạt tính của chế phẩm oligosacarit.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic, bao gồm hỗn hợp điaxit mannuronic có công thức (III) hoặc muối được dụng của nó:



trong đó n là số nguyên từ 1 đến 9, m là 0, 1 hoặc 2, m' là 0 hoặc 1, và $m+m'=1$ hoặc 2,

và trong đó,

tổng trọng lượng điaxit mannuronic trong đó $n = 1-5$ là 80-95% tổng trọng lượng chế phẩm; và

tỷ lệ tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ với tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $n = 4-7$ là trong phạm vi từ 1,0 đến 3,5.

2. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 1$ hoặc 2 không thấp hơn 50% hoặc hơn tổng trọng lượng chế phẩm.

3. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 2, trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 1$ không thấp hơn 10% tổng trọng lượng chế phẩm.

4. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 2$ không thấp hơn 10% tổng trọng lượng chế phẩm.

5. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ là 20-70% tổng trọng lượng chế phẩm.

6. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tỷ lệ tổng trọng lượng điaxit mannuronic trong đó $n = 1-3$ với tổng trọng lượng điaxit mannuronic trong đó $n = 4-7$ trong phạm vi từ 1,0 đến 3,0.

7. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tỷ lệ phần trăm trọng lượng điaxit mannosonic có các độ polyme hóa khác nhau trong chế phẩm là: 5-25% disacarit, 15-30% trisacarit, 15-25% tetrasacarit, 10-25% pentasacarit, 5-15% hexasacarit, 3-10% heptasacarit, 2-5% octasacarit, 1-5% nonasacarit, và 1-5% decasacarit.
8. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 7, trong đó tỷ lệ phần trăm trọng lượng của điaxit mannosonic có các độ polyme hóa khác nhau trong chế phẩm là: 10-20% disacarit, 18-30% trisacarit, 15-25% tetrasacarit, 15-20% pentasacarit, 5-10% hexasacarit, 3-5% heptasacarit, 2-3% octasacarit, 1-3% nonasacarit, và 1-3% decasacarit.
9. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm từ 1, trong đó muối được dụng là muối natri hoặc muối kali.
10. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 1$ hoặc 2 là 60-90% tổng trọng lượng chế phẩm.
11. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 1$ hoặc 2 là 70-90% tổng trọng lượng chế phẩm.
12. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 1$ là 30-40% tổng trọng lượng chế phẩm.
13. Chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, trong đó tổng trọng lượng của điaxit mannuronic trong đó $m + m' = 2$ là 30-50% tổng trọng lượng chế phẩm.
14. Dược phẩm bảo vệ sức khỏe, bao gồm lượng có hiệu quả chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, và chất mang thích hợp, tùy chọn.
15. Sản phẩm bảo vệ sức khỏe, bao gồm lượng có hiệu quả của chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, và chất mang thích hợp, tùy chọn.
16. Phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit của điaxit mannuronic theo điểm 1, phương pháp bao gồm thoái biến oxy hóa bằng ozon axit homopolymannuronic.

17. Phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit theo điểm 16, trong đó:

phản ứng oxy hóa được tiến hành ở nhiệt độ 0-70 °C; và

bước thoái biến oxy hóa được tiến hành ở độ pH 3-13.

18. Phương pháp điều chế chế phẩm oligosacarit theo điểm 16, trong đó:

phản ứng oxy hóa được tiến hành ở nhiệt độ 10-45 °C; và

bước thoái biến oxy hóa được tiến hành ở độ pH 4-10.

Fig. 1

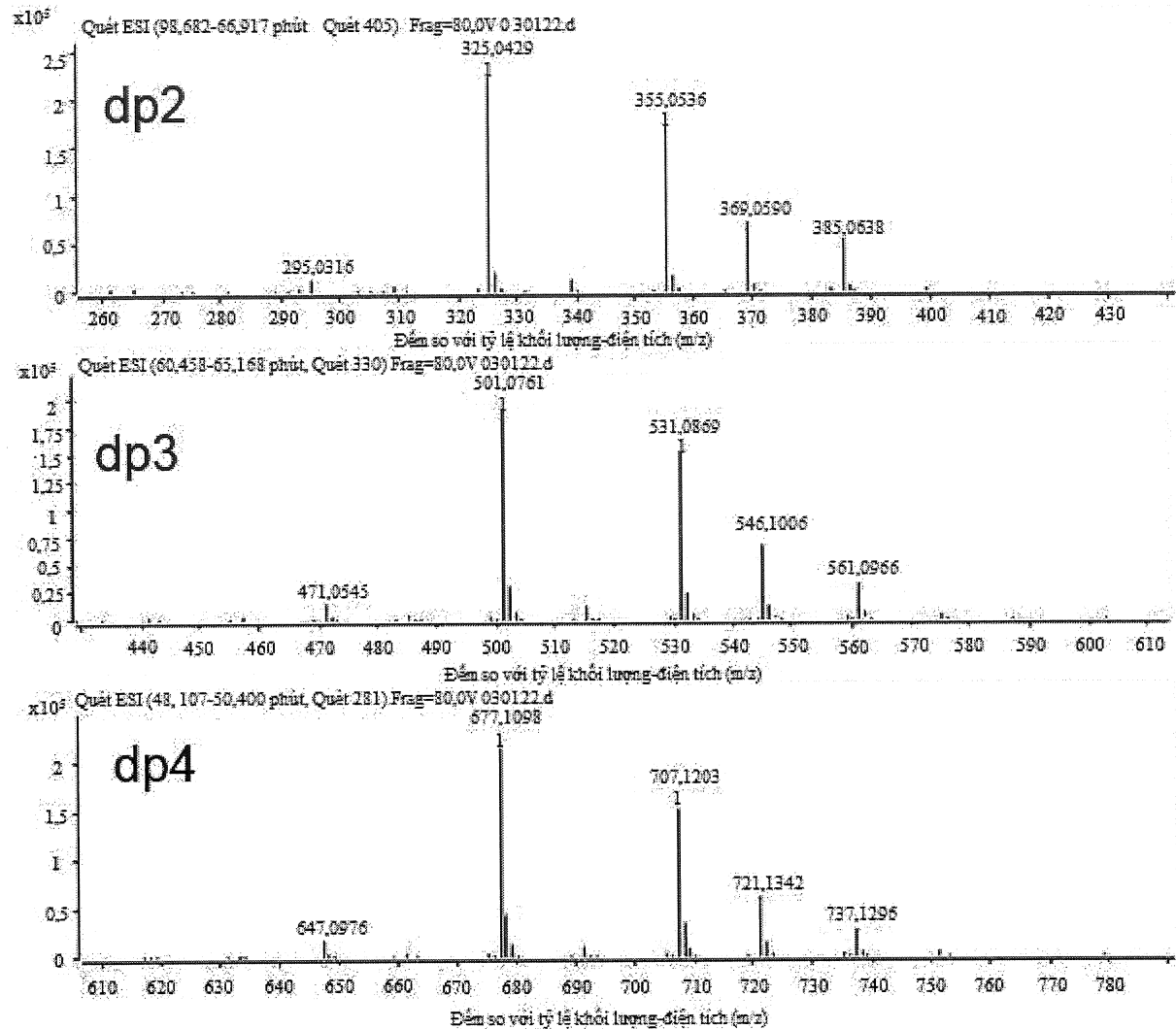


Fig. 2

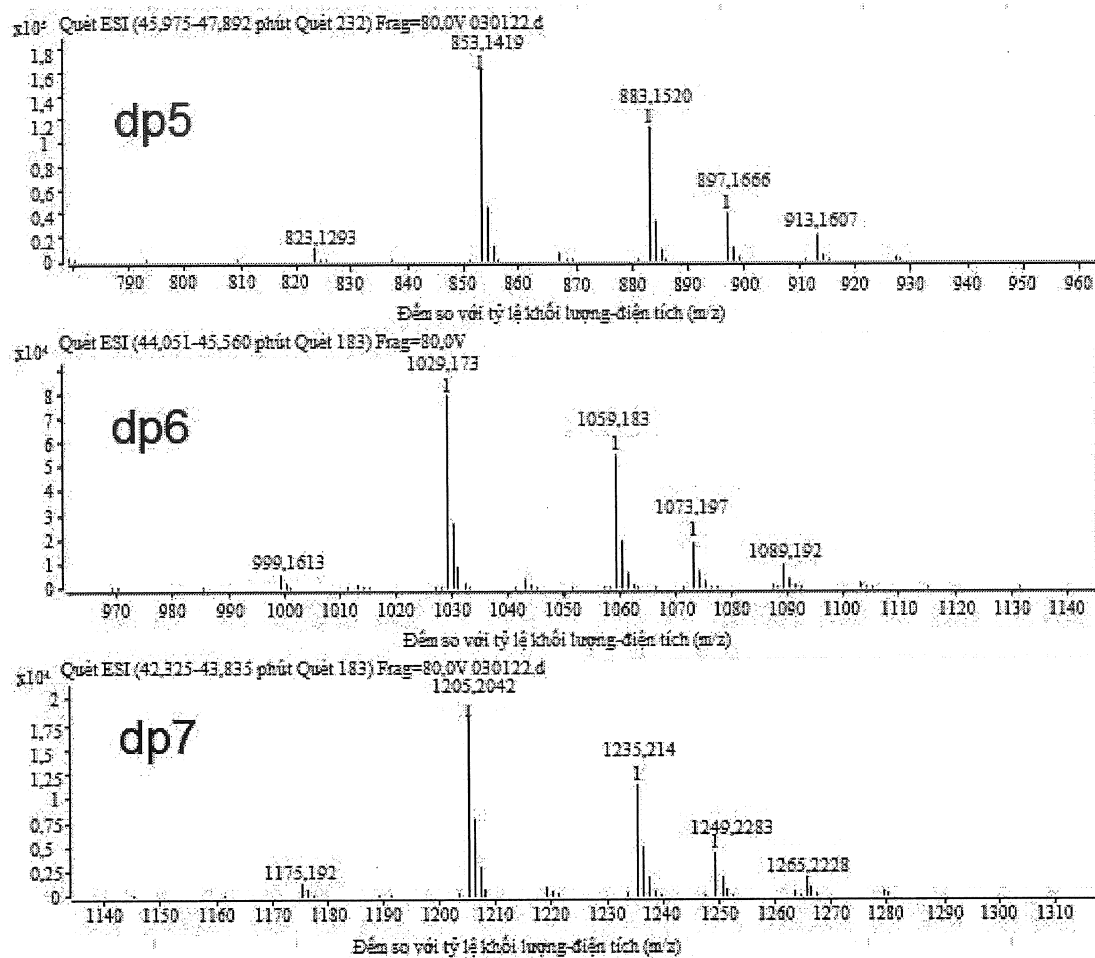


Fig. 3

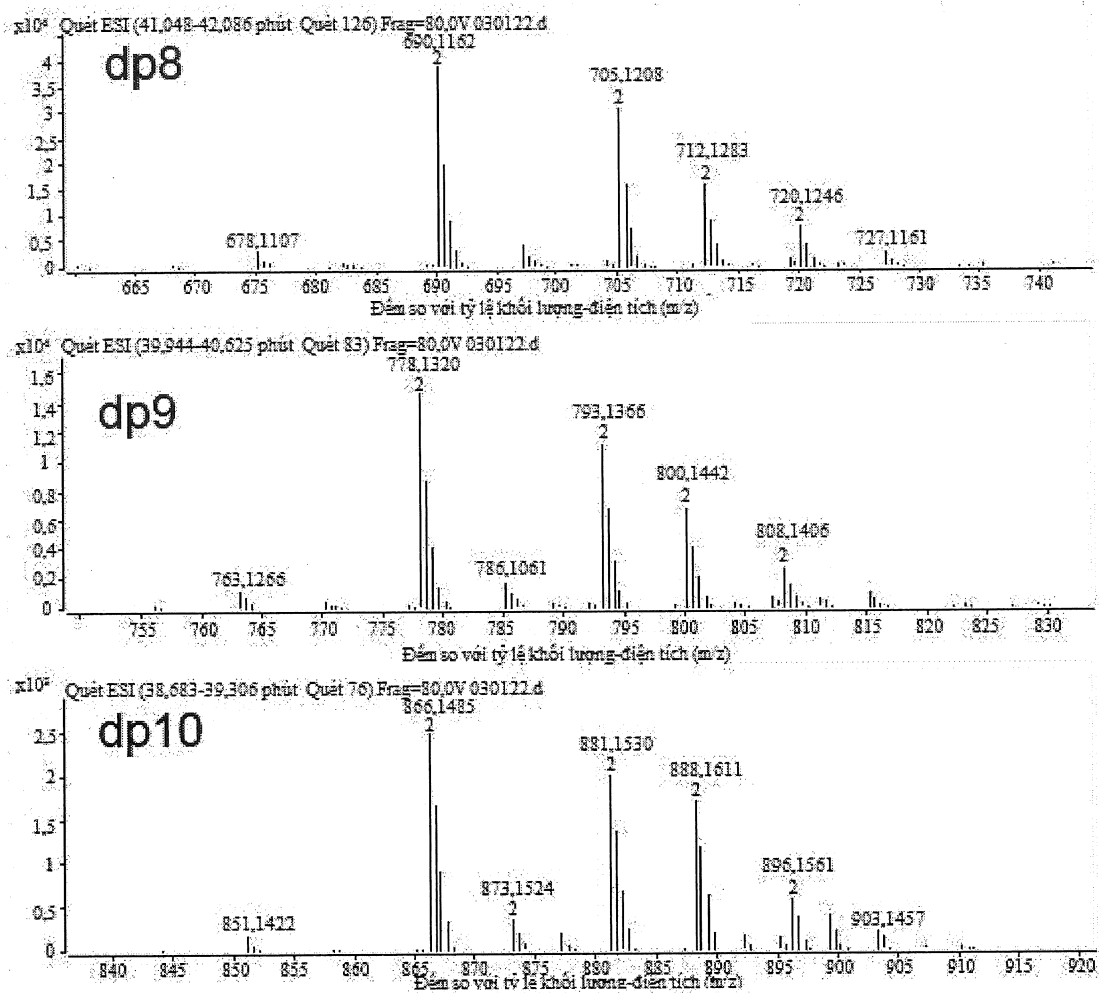


Fig. 4

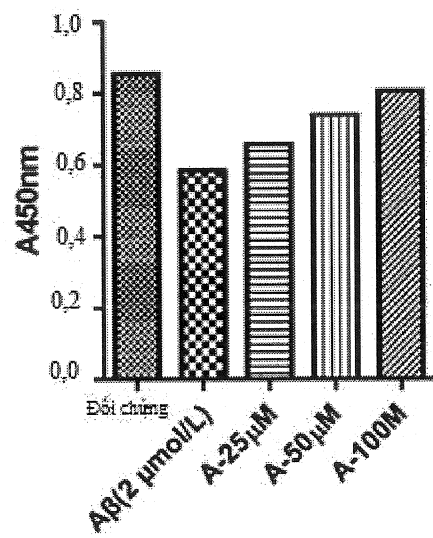


Fig. 5

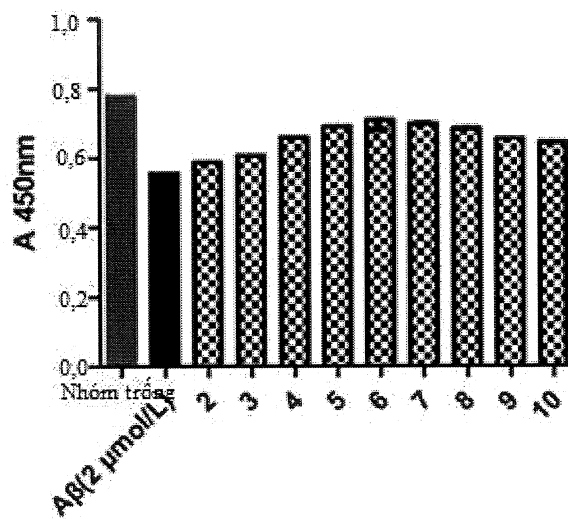


Fig. 6

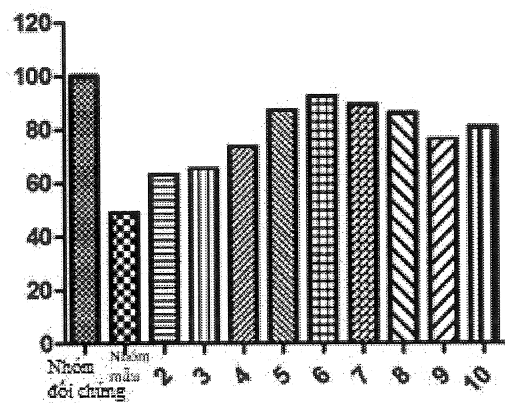


Fig. 7

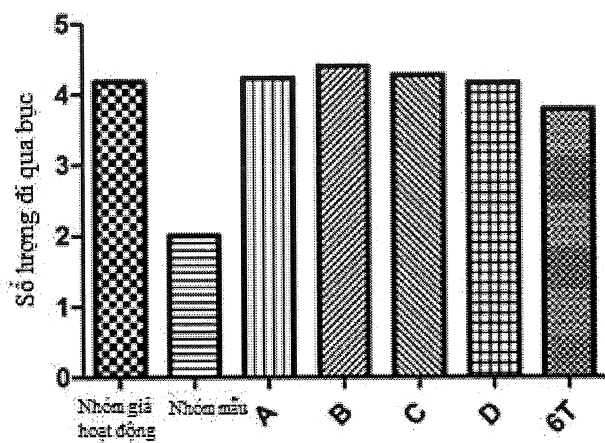


Fig. 8

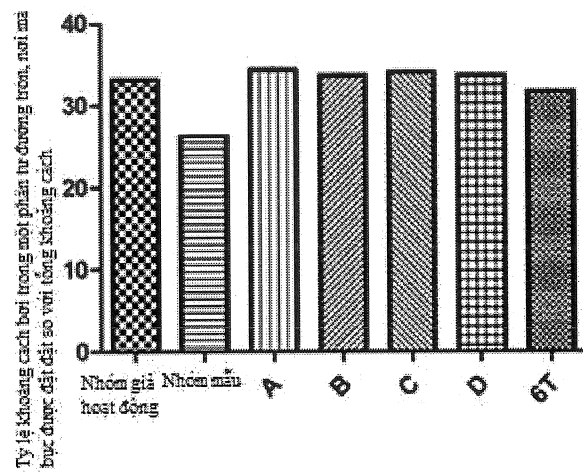


Fig. 9

