



MD 1617 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **1617** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.⁷**: C 08 B 37/08

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2000 0057 (22) Data depozit: 2000.03.28	(43) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului pe răspunderea solicitantului: 2001.02.28, BOPI nr. 2/2001
(71) Solicitant: Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova, MD	
(72) Inventatori: Lutan Vasile, MD; Bezdraghin Mariana, MD	
(73) Titular: Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova, MD	

(54) **Procedeu de obținere a acidului hialuronic**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la procedeu de obținere a acidului hialuronic biocompatibil de uz medical.

Esența invenției constă în obținerea acidului hialuronic din cordonalele ombilicale umane și înlăturarea impurităților neproteice din ele până la etapa de extragere a acidului hialuronic. Preliminar se efectuează înlăturarea impurităților neproteice din cordonalele ombilicale întregi prin dializă în etanol 96% la temperatura de -15...-20°C și apoi

2
5 in ser fiziologic la +4°C, câte 24 ore fiecare etapă, după care dializa se repetă în aceleași condiții utilizând cordonale ombilicale mărunțite de 2...4 mm până la obținerea unor soluții transparente.

10
Rezultatul constă în ameliorarea calității produsului final, simplificarea procedurii de obținere a acidului hialuronic biocompatibil de uz extern și parenteral.

Revendicări: 1

15

MD 1617 G2

MD 1617 G2

3

Descriere:

Invenția se referă la procedeul de obținere a acidului hialuronic biocompatibil de uz medical.

5 Este cunoscut procedeul de obținere a acidului hialuronic din creste de cocoș, care constă în colectarea, conservarea și păstrarea materialului biologic, extragerea acidului hialuronic în ser fiziologic, deproteinizarea, înlăturarea impurităților neproteice și cristalizarea acidului hialuronic [1].

10 Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că acidul hialuronic este extras din creste de cocoș împreună cu substanțele biologice ce se conțin în organ. Din această cauză produsul este inițial contaminat cu substanțe bioactive extrase din materialul biologic (proteine, nucleotide, enzime, lipide, fosfolipide, lipoproteine etc. cu proprietăți antigenice, pirogene, fluorogene), care ulterior necesită procedee laborioase și costisitoare de purificare a acidului hialuronic, ceea ce micșorează esențial randamentul procedurii și sporește prețul produsului final.

15 Cel mai apropiat este procedeul de obținere a acidului hialuronic din cordoane ombilicale umane care constă în colectarea, conservarea și păstrarea materialului biologic, extragerea acidului hialuronic în ser fiziologic, deproteinizarea, înlăturarea impurităților neproteice și cristalizarea acidului hialuronic [2].

20 Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că acidul hialuronic este extras din cordoane ombilicale umane împreună cu substanțele biologice ce se conțin în organ. Din această cauză produsul este inițial contaminat cu substanțe bioactive extrase din materialul biologic (proteine, nucleotide, enzime, lipide, fosfolipide, lipoproteine etc. cu proprietăți antigenice, pirogene, fluorogene), care ulterior necesită procedee laborioase și costisitoare de purificare a acidului hialuronic, ceea ce micșorează esențial randamentul procedurii și sporește prețul produsului final. Un alt dezavantaj constă în faptul că în procedeul celei mai apropiate soluții produsul final prezintă acid hialuronic liofilizat. Liofilizarea este un proces îndelungat, costisitor și duce la degradarea acidului hialuronic.

25 Problema pe care o rezolvă invenția este elaborarea unui procedeu simplu de obținere a acidului hialuronic biocompatibil și adecvat pentru uz extern și parenteral.

30 Esența invenției constă în colectarea, conservarea și păstrarea materialului biologic, extragerea acidului hialuronic în ser fiziologic și purificarea lui prin cristalizare, iar suplimentar se efectuează înlăturarea impurităților neproteice din materialul biologic până la etapa de extragere a acidului hialuronic prin dializa cordoanelor ombilicale întregi în etanol de 96% la temperatura de -15...-20 °C și apoi în ser fiziologic la +4°C, câte 24 ore fiecare etapă, după care dializa se repetă în aceleași condiții utilizând cordoane ombilicale mărunțite de 2...4 mm până la obținerea unor soluții transparente.

Rezultatul invenției constă în ameliorarea calității produsului final, simplificarea procedurii de obținere a acidului hialuronic biocompatibil și adecvat pentru uz extern și parenteral.

35 Procedeul se efectuează în felul următor.

Cordoanele ombilicale se șterg de sângele de pe suprafață, iar sângele din vasele ombilicale se scurge minuțios în mod mecanic.

40 Cordoanele ombilicale întregi sunt dializate mai întâi în etanol de 96% în raport masă/volum de 1:2 la temperatura de -15...-20°C timp de 24 ore, iar apoi sunt dializate în ser fiziologic în raport masă/volum de 1:2 timp de 24 ore la temperatura de +4°C. Cordoanele ombilicale întregi după dializă în etanol de 96% și ser fiziologic sunt mărunțite în mod mecanic, iar fragmentele mărunte sunt dializate mai întâi în etanol de 96% în raport masă/volum de 1:2 la temperatura de -15...-20°C timp de 24 ore, iar apoi sunt dializate în ser fiziologic în raport volumetric de 1:2 timp de 24 ore la temperatura de +4°C

45 După înlăturarea substanțelor străine din cordoanele ombilicale întregi și din fragmentele mărunțite acidul hialuronic se extrage, se deproteinizează, se cristalizează și se păstrează până la utilizare.

Exemplu.

1 kg de cordoane ombilicale colectate de la lăuzele sănătoase în intervalul de 30 min după eliminarea placentei sunt separate de placentă, se șterg de sângele de pe suprafață, iar sângele din vasele ombilicale se scurge minuțios în mod mecanic.

50 La 1 kg de cordoane ombilicale se adaugă 2 L de etanol de 96% și se lasă la temperatura de -15...-20°C timp de 24 ore. Peste 24 ore etanolul se scurge și se înlocuiește cu același volum de etanol proaspăt și se mai lasă 24 ore la temperatura de -15...-20°C. Procedura se mai repetă de 1...2 ori până când faza etanolică

rămâne transparentă.

55 1 kg de cordoane ombilicale din procedura precedentă este amestecat cu 2 L de soluție izotonică de clorură de sodiu și amestecul se lasă timp de 24 ore la temperatura de +4°C. Procedura se repetă de două ori cu porții proaspete de ser fiziologic. După 24 ore apa se scurge, iar la cordoanele ombilicale hidratate se adaugă 2 L de etanol de 96% și se lasă la temperatura de -15...-20°C timp de 24 ore.

MD 1617 G2

4

1 kg de cordoane ombilicale obținut în procedura precedentă sunt mărunțite în mod mecanic în mașina de tocat din oțel inoxidabil până la particule de 2...4 mm, iar masa mărunțită este amestecată cu 2 L de etanol de 96% și păstrată la temperatura de -15...-20°C timp de 24 ore. Peste 24 ore etanolul este scurs și înlocuit cu același volum de etanol proaspăt, iar amestecul se păstrează la fel 24 ore, la temperatura de -15...-20°C. Procedura este repetată de 1...2 ori, până când fracția etanolică rămâne transparentă.

1 kg de masă mărunțită de cordoane ombilicale și spălată în etanol conform procedurii precedente se amestecă cu 2 L de ser fiziologic și se păstrează la temperatura de 0...+4°C timp de 24 ore. Peste 24 ore faza apoasă este atent decantată, iar masa solidă este din nou amestecată cu 2 L de ser fiziologic, lăsată în frigider la temperatura de +4°C, timp de 24 de ore, după care masa solidă este separată de lichid prin decantare. Procedura se mai repetă o dată.

La masa de cordoane ombilicale mărunțite și hidratate în procedura precedentă se adaugă 2 L de ser fiziologic, se amestecă în mod mecanic (se freacă pe un filtru de tifon) pentru desprinderea acidului hialuronic de cordoanele mărunțite, iar extractul lichid de acid hialuronic se separă de masa solidă prin filtrare prin câteva straturi de tifon. La masa solidă separată se adaugă 2 L de ser fiziologic, se lasă în frigider la temperatura de +4°C timp de 24 ore, după care se filtrează repetat. Procedura se mai repetă o dată, iar porțiile de extras de acid hialuronic sunt păstrate izolat.

Fiecare din cele trei porții de extras de acid hialuronic (câte 2 L) este filtrată prin câteva straturi de tifon și la fiecare porție se adaugă 500 g clorură de sodiu până la concentrația finală de 25%, amestecându-se ușor până la dizolvarea sării. Soluțiile sunt păstrate în frigider 24 ore, iar apoi centrifugate la 2500 rot./min timp de 1 oră pentru înlăturarea particulelor mari de țesut.

Pentru cristalizarea acidului hialuronic fiecare porție de 2 L de supernatant obținut la centrifugare se amestecă cu 6 L de etanol de 96% și se agită mecanic ușor până la formarea unei rețele de cristale de acid hialuronic ușor separabile de etanol. Cristalele de acid hialuronic se extrag cu un bastonaș de sticlă și se scufundă în 0,1 L de etanol de 96%.

Cristalele de acid hialuronic obținute în etapa precedentă sunt redizolvate în ser fiziologic în volum egal cu volumul supernatantului și se păstrează la 0...+4°C, timp de 24 ore. Peste 24 ore acidul hialuronic înmuiat se amestecă atent și se supune recristalizării prin procedeul descris mai sus. Procedura recristalizării se repetă de 2-3 ori, până când soluția de acid hialuronic rămâne transparentă (sau ușor opalescentă).

Pentru deproteinizare acidul hialuronic dizolvat în 0,5 L de ser fiziologic ajustat până la pH 6,0, se amestecă cu 1 L de cloroform, se agită ușor până la formarea suspensiei fine, iar apoi se centrifughează la 8000 rot./min 30 min. Faza superioară de acid se colectează, iar faza de cloroform și faza intermediară de proteine se înlătură. Procedura se repetă cu porții proaspete de cloroform de 3-4 ori, până când soluția de hialuronat de natriu rămâne transparentă. După ultima procedură de deproteinizare acidul hialuronic se cristalizează prin procedura descrisă mai sus.

Acidul hialuronic obținut astfel se păstrează în formă de fibre în etanol de 96% în flacoane închise ermetic fără degradare timp de 24 luni la temperatura de 0...+4°C.

Soluția lichidă de acid hialuronic de 0,1...1% obținută prin procedeul propus reprezintă un lichid vâcos, greu eculent, srtăveziu sau puțin opalescent, fără miros, fără culoare, cu reacția slab acidă (pH 6,0). Spectrul densității optice a sol. AH măsurat la 400...700 nm demonstrează maxim de 520...540 nm, ceea ce este specific pentru acidul hialuronic.

Densitatea optică a acidului hialuronic de 0,5% determinată la 257 nm (maximul de absorbție a nucleotidelor) a fost egală cu 0,712 un., iar la 280 nm (maximul absorbției pentru proteine) - cu 0,622 un.

Concentrația proteinelor determinată prin metoda Lowry a fost egală cu 0,2 g/L, ceea ce constituie 5% din masa totală a substanțelor dizolvate. Astfel, conținutul de acid hialuronic este de 95% (m/m).

Viscozitatea relativă a sol. AH de 0,2% măsurată prin metoda viscozimetriei capilare a fost egală cu 5,0.

Toxicitatea acidului hialuronic a fost determinată în conformitate cu metoda descrisă în Farmacopea XI, vol.2 și a demonstrat lipsa toxicității.

Pirogenitatea acidului hialuronic a fost determinată în conformitate cu metoda descrisă în Farmacopea XI, vol.2 și a demonstrat lipsa pirogenității.

Alergogenitatea acidului hialuronic a fost determinată în proba anafilactică prin sensibilizarea i/m repetată a iepurilor de laborator la a 3, 5 și 14-a zi cu hialuronat și infuzie i/v a dozei declanșatoare de acid hialuronic peste 2 săptămâni după administrarea ultimei doze sensibilizante. Experiențele au demonstrat lipsa alergogenității acidului hialuronic.

Acțiunea hepatotoxică și cardiotoxică a acidului hialuronic a fost determinată prin studierea concentrației de bilirubină totală în sânge și a activității alaninaminotransferazei (ALT) și asparta-

MD 1617 G2

5

taminotransferazei (AST) în serul sanguin și a demonstrat lipsa hepato- și cardiotoxicității acidului hialuronic.

5 Acțiunea asupra metabolismul mineral a fost testată prin dozarea fosforului anorganic și a calciului ionizat în sânge la iepurii tratați cu acid hialuronic și s-a constatat că el nu influențează negativ metabolismul calciului și fosforului.

Acțiunea iritantă a fost testată prin aplicarea locală pe urechea iepurilor de laborator a soluției de acid hialuronic timp de 2 săptămâni și a dovedit lipsa proprietăților local iritante.

10 Or, prin procedeul propus am obținut acid hialuronic cu proprietăți fizice și fizico-chimice identice cu cele obținute prin procedeul celei mai apropiate soluții, biocompatibil și inofensiv, care nu posedă toxicitate, pirogenitate, alergogenitate, nu afectează ficatul, miocardul și metabolismul mineral și poate fi utilizat în scopuri medicale prin aplicare externă și administrare parenterală. Procedeul este mai simplu, mai puțin costisitor și rentabil pentru producere.

15

(57) Revendicare:

20 Procedeul de obținere a acidului hialuronic, care include colectarea, conservarea și păstrarea cordonelor ombilicale, extragerea acidului hialuronic în ser fiziologic și purificarea lui prin cristalizare, **caracterizat prin aceea că** până la etapa de extragere a acidului hialuronic preliminar se efectuează înlăturarea impurităților neproteice din cordonalele ombilicale întregi prin dializă în etanol 96% la temperatura de -15...-20°C și apoi în ser fiziologic la +4°C, câte 24 ore fiecare etapă, după care dializa se repetă în aceleași condiții utilizând cordonale ombilicale mărunțite de 2...4 mm până la obținerea unor soluții transparente.

25

(56) Referințe bibliografice:

1. Balazs E. A., Healon (Sodium hyaluronate). Eds. Miller D., Stegman R., New York , 1983, p. 5
2. US 4141973 C2

Șef Secție: EGOROVA Tamara

Examinator: GROSU Petru

Redactor: ANDRIUȚĂ Victoria