



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00441**

(22) Data de depozit: **11/06/2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2016** BOPI nr. **12/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**30/12/2009** BOPI nr. **12/2009**

(73) Titular:  
• **BIOTEHNOS S.A., STR. GORUNULUI  
NR.3-5, OTOPENI, IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **ROȘOIU NATALIA, ALEEA HORTENSIEI  
NR.15, BL.O 3, SC.D, ET.4, AP.78,  
CONSTANȚA, CT, RO;**

• **MÂNZATU IOAN, STR. SANDU ALDEA  
NR.49 SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **NIȚĂ ROXANA ANDREEA, STR.PRAVĂȚ  
NR.20, BL.P 9, SC.7, ET.4, AP.140,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **OLARIU LAURA, BD.ION MIHALACHE  
NR.42-52, BL.35, SC.B, ET.10, AP.79,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**GB 2347349 A; RO 110780 B;  
US 2003023079 A1; US 2007010430 A1**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR GLICOZAMINOGLICANI**



# RO 125098 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor glicozaminoglicani cu  
acțiune restitativ tisulară, antiproliferativă, biostimulatoare, anticoagulantă, antitrombotică,  
3 antilipemică, antiaterosclerotică, antiinflamatoare etc., de uz uman și/sau veterinar.

Glicozaminoglicanii, cunoscuți și sub denumirea de mucopolizaharide [**G. Douglas Andersen, „Dynamic Chiropractic”, vol.16, no.II, USA, 1998**], sunt lanțuri lungi de unități  
5 diglucidice repetitive, formate din hexozamine (glucozamină sau galactozamină) acetilate  
7 sau sulfurate și acizii uronici precum: acidul glucuronic, acidul galacturonic, acidul iduronic.  
Glicozaminoglicanii reprezintă componenta majoritară a proteoglicanilor, care, împreună cu  
9 celulele condrocite și colagenul, formează cartilajul.

Proteoglicanii sunt compuși extracelulari și alcătuiesc substanța fundamentală a  
11 tuturor tipurilor de țesuturi conjunctive. Predomină în structura țesutului conjunctiv, a  
membranelor celulare, a epifizei oaselor lungi, cartilajelor și ligamentelor, a mucusului  
13 epitelial, a umorii vitroase, a corneei, a substanțelor mucinoase cu acțiune lubrifiantă, a  
mucinei din mucoasa intestinală, salivă, lapte, plasmă [**Șerban M., Roșoiu Al., „Substanțe  
15 biologic active din organisme marine”, Ed. Academiei Române, 1992; Roșoiu N.,  
Șerban M., Biochimie medicală, vol. I, "Principii de organizare moleculară", Ed.  
17 Muntenia, 2003**].

Sunt macromolecule liniare ce rețin cantități mari de apă datorită prezenței unui  
19 număr mare de grupări acide ionizate ( $-\text{COO}^-$  și  $-\text{O}-\text{SO}_3^-$ ). Formează soluții coloidale, geluri,  
care alcătuiesc un ciment intercelular flexibil, cu proprietăți lubrifiante și antișoc. În substanța  
21 fundamentală a țesutului conjunctiv se află cea mai mare parte din conținutul total de apă al  
organismului.

În structura proteoglicanilor, componenta glucidică majoritară (glicozaminoglicani)  
23 este asociată cu componenta proteică prin legături ionice și covalente. Acești glicozamino-  
glicani din cartilajul articular sunt constituenții majoritari ai condroitin sulfatilor (circa 55%) și  
25 dermatan sulfatului (circa 40%). Acidul hialuronic reprezintă 1...10%.

Acidul hialuronic este o substanță cu masă moleculară mare, care se compune din  
27 acid D-glucuronic și N-acetilglucozamină care se leagă în poziția  $\beta$ -1,3, formând unitatea  
29 diglucidică repetitivă, denumită acid hialobiuronic. Acidul hialuronic, singurul glicozaminoglican  
(GAG) nesulfatat, se pare că nu este legat covalent de o moleculă proteică. El poate forma  
31 însă arhitecturi moleculare "gigant" prin asamblare cu proteoglicani conținând cu precădere  
condroitinsulfați.

Acidul hialuronic se găsește răspândit în substanța fundamentală a țesutului conjunctiv,  
33 cartilaje, cornee, în umoarea vitroasă, în lichidul sinovial, în cordonul ombilical etc., îndeplinește  
rol de liant tisular, acționând ca un "ciment intercelular". Calitățile structurale descrise și  
35 comportarea vâsco-elastică a soluțiilor sale îl fac un bun lubrifiant și "absorbant al șocurilor".

Macromolecula de acid hialuronic poate fi depolimerizată, respectiv, hidrolizată  
37 specific de enzima denumită hialuronidază, prezentă în spermatozoizi, veninuri, diferite  
bacterii și țesuturi animale, ceea ce duce la alterarea capacității de filtru selectiv al substanței  
39 fundamentale, și la expunerea țesuturilor la invazia bacteriană. Sub acțiunea hialuronidazei,  
41 se rupe legătura  $\beta$ -1,4 dintre acidul glucuronic și N-acetilglucozamină. Biosinteza acidului  
hialuronic are loc la nivelul fibroblastelor și are o "jumătate a timpului de reinnoire" scurtă  
43 (2 zile), ceea ce impune formarea sa continuă. Concentrația de acid hialuronic crește în  
timpul morfogenezei și a reparării tisulare. Importanța sa biologică este corelată cu aceea  
45 a hialuronidazelor. În serul sanguin există o antihiuronidază (inhibitor fiziologic de  
hialuronidază - PHI) care inhibă acțiunea hidrolizantă a hialuronidazei.

# RO 125098 B1

Heparan sulfatul și heparina, glicozaminoglicanii sulfurați prezenți în sânge, aortă și plămâni sunt larg cunoscuți pentru acțiunea lor anticoagulantă.	1
Condroitinsulfații sunt constituiți din acizi uronici (glucuronic sau galacturonic) și N-acetil-galactozamină pe care este grețat radicalul acidului sulfuric la -OH de la C4 sau C6; între acidul glucuronic și N-acetilgalactozamină se realizează o legătură glicozidică $\beta$ -1,3, formându-se unitatea diglucidică repetitivă, denumită condrozină, care se leagă de unități similare în poziția $\beta$ -1,4; aceste unități diglucidice se policondensează, formând macromolecula poliglucidică, ce se atașează electrovalent la o componentă proteică. În funcție de poziția pe care o ocupă în molecula N-acetilgalactozaminei radicalul acidului sulfuric, se întâlnesc condroitin-4-sulfați și condroitin-6-sulfați, sau condroitinsulfați A și C, ambele sensibile la acțiunea hialuronidazei.	3 5 7 9 11
Se găsesc distribuiți în cartilajii, oase, tendoane, piele, aortă, cornee.	
Numărul mare de sarcini negative din molecula condroitin sulfaților îi consacră ca "rășini" schimbătoare de cationi, cu rol important în reglarea homeostaziei matricei cartilajului și în mineralizarea matricei osoase.	13 15
Proteoglicanii conținând condroitin sulfați se asociază, prin intermediul unor proteine de legare, cu acidul hialuronic, formând agregate supramoleculare de dimensiuni foarte mari (circa 100 de molecule de proteoglicani/molecula de acid hialuronic), cu masă moleculară de ordinul sutelor de milioane.	17 19
Condroitinsulfatul B (CSA-B) sau dermatansulfatul conține, în locul acidului glucuronic, izomerul steric al acestuia la C5, acidul iduronic. Dermatansulfatul este un constituent principal al țesutului conjunctiv dermic; mai este prezent în tendoane, valvele cardiace, peretele vascular.	21 23
Heparina este un glicozaminoglican având o serie de particularități structurale din care decurg și unele particularități funcționale. Principala particularitate structurală a heparinei o constituie cantitatea importantă de grupări sulfat legate la azotul aminic (grupări N-sulfat). Sulfatarea glucozaminei este numai parțială, 50 la sută din radicalii de glucozamină fiind acetilați. Grupările O-sulfat sunt localizate în general la C6 al glucozaminei și C2 al acidului iduronic sau glucuronic.	25 27 29
Heparina se găsește în sânge, aortă și plămâni. Spre deosebire de ceilalți glicozaminoglicani, heparina nu este un component intracelular, ea fiind sintetizată în mastocitele care bordează peretele arterial în ficat, piele și plămân. Are rol de anticoagulant fiziologic al sângelui, împiedicând coagularea spontană a sângelui.	31 33
Heparinele au și rol de coenzimă în sistemul lipoproteinlipază din pereții capilarelor, enzimă ce acționează asupra chilomicronilor din plasmă și a lipoproteinelor cu densitate foarte joasă (producând hidroliza trigliceridelor), servind astfel la înlăturarea tulburării produse de chilomicroni, de unde și denumirea de factor de clarifiere a plasmei.	35 37
Glicozaminoglicanii neutri sunt alcătuiți din hexozamine acetilate: N-acetilglucozamina, N-acetilgalactozamina, oze, acid neuraminic etc. Nu conțin acizi uronici.	39
Keratansulfații se găsesc în coarne și cartilajii sub formă de agregate cu condroitinsulfații. În majoritate se găsesc sub formă de complecși cu proteinele din piele și țesutul conjunctiv, și prezintă asemănări cu mucoidele din salivă, tractul gastrointestinal, secrețiile nazale, chisturile ovariene și cu glicoproteidele sanguine.	41 43
Keratanul care nu conține acid uronic este prezent în discurile intervertebrale, în trahee și în cartilajul nazal.	45
Catabolismul proteoglicanilor, respectiv, al glicozaminoglicanilor se realizează cu participarea unor enzime specifice, cu localizare lizozomală. Prin degradarea proteoglicanilor se pun în libertate componentele structurale ale glicozaminoglicanilor (unitățile diglucidice	47

1 repetitive) și apoi ozele, hexozaminele și acizii uronici. Degradarea proteoglicanilor decurge,  
2 pe de o parte, prin hidroliza componentei proteice de către proteinaze și, pe de altă parte,  
3 prin clivarea enzimatică a lanțului poliglucidic de către endoglicozidaze, sau prin ruperea  
4 lanțului sub acțiunea exoglicozidazelor, cu eliberarea progresivă de grupări glicozidice de la  
5 capătul nereducător al lanțului poliglucidic. O endoglicozidază - hialuronoglucozaminidaza,  
6 denumită și hialuronidază, scindează legăturile  $\beta$ -1,4 între N-acetilglucozamină și acid D-  
7 glucuronic din macromolecula acidului hialuronic. Această enzimă a fost inițial identificată  
8 în bacterii, dar apoi s-a stabilit că este ubicuitară [Roșoiu N, Șerban M., Badiu Ghe.,  
9 **Biochimie clinică, "Metode și tehnici de laborator - Editura Muntenia, 2005; Roșoiu N,  
10 Șerban M., "Metode și tehnici de laborator în biochimie", Editura Paralela 45, colecția**  
11 **Vadecum, Educațional, 2002].**

12 De asemenea, radicalul superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) este implicat în depolicondensarea acidului  
13 hialuronic în bolile inflamatorii ale articulațiilor. Reacția între  $O_2^{\cdot-}$  și  $H_2O_2$  (ambele fiind  
14 secretate de către granulocitele polimorfonucleare pe parcursul fagocitozei) conduce la  
15 formarea  $OH^{\cdot}$  (radical hidroxil) care, probabil, determină clivarea legăturii glicozidice.  
16 Conversia  $O_2^{\cdot-}$  de către superoxidismutază (SOD) împiedică depolicondensarea acidului  
17 hialuronic.

18 Hialuronoglucozaminidaza (hialuronidaza) clivează nu numai acidul hialuronic, ci și  
19 condroitinsulfații din cartilajii.

20 Prin reducerea dimensiunii moleculelor, viscozitatea gelurilor de acid hialuronic și  
21 condroitinsulfați scade, devenind posibilă pătrunderea unor compuși sau corpuri străine în  
22 spații intercelulare. Eliberarea hialuronidazei de către bacterii în țesuturile infectate  
23 facilitează răspândirea acestora în organism.

24 În procesele degenerative, glicozaminoglicanii de tip acid (acidul hialuronic și  
25 condroitinsulfații) sunt intens scindați de hialuronidază, matricea extracelulară - substanța  
26 fundamentală - a țesuturilor conjunctiv și cartilajinos fiind distrusă.

27 Glicozaminoglicanii sunt biopolimeri extrași industrial din diferite organe de la  
28 animale.

29 Cererea de brevet de invenție **US 2003/0023079** prezintă un procedeu de obținere  
30 a unor glicozaminoglicani derivați de la heparinoizi (având în principal o puternică activitate  
31 anticoagulantă și antitrombotică), pornind de la polizaharidele K5 extrase din bacteria  
32 *Escherichia Coli*.

33 Cererea internațională de brevet de invenție **WO 02/076475** prezintă un procedeu de  
34 obținere doar a heparinei și heparinoizilor cu acțiune anticoagulantă, obținuți din pește, în  
35 special din branhiile, intestine, piele de la somon, dar și din alte tipuri de pește, precum: crap,  
36 cod, hering, sardele, macrou, șprot și chiar din rechin, cu acțiune exclusiv anticoagulantă și  
37 antitrombotică.

38 Cererea de brevet de invenție **GB 2347349/2000** prezintă o compoziție farmaceutică  
39 având proprietăți antiinflamatoare, ce cuprinde extract de proteine din midie (*Perna*  
40 *canaliculus*) din Noua Zeelandă, și hexozamine sulfurate.

41 Această compoziție poate fi utilizată în tratamentul osteoartritelor și artritelor  
42 reumatoide. Combinația extractului de proteine din midie și hexozamine sulfurate este  
43 sinergică față de efectul avut de fiecare componentă a combinației în parte, la aceeași  
44 concentrație. Compoziția preferată în această invenție include un amestec omogen de pudră  
45 uscată și înghețată conținând circa 66,6% extract de proteine din midie și circa 33,3% pudră  
a unui glicozaminoglican, ce poate fi administrată sub formă de capsule sau tablete.

# RO 125098 B1

Cererea de brevet de invenție **AU 2002242861/2002** prezintă glucozaminoglicani cu activitate anticoagulantă, obținuți din branhiile de pești și, mai ales, din intestine, piele, coadă și branhiile de somon, precum și o metodă de tratament ce cuprinde administrarea anticoagulantului ce conține o cantitate eficientă de astfel de glicozaminoglicani. 1  
3

Cererea de brevet de invenție **US 20070010430**, din 11.01.2007, în baza PCT/JP04/03432, prezintă proteoglicani ce conțin glicozaminoglicani izolați din pești cartilagineși, precum și o compoziție farmaceutică având efect antitumoral. 5  
7

Cererea de brevet de invenție publicată cu nr. **JP 2006089632** prezintă o metodă de obținere a unei substanțe cu activitate anticoagulantă (de tip heparină), din organisme marine, cu două etape, în care în prima se obțin glicozaminoglicani, iar în a doua se izolează respectiva substanță. 9  
11

Datele cunoscute din brevetele de invenție de mai sus au dezavantajul că fiecare dintre ele prezintă doar câte un tip de acțiune terapeutică, precum: anticoagulantă, antitrombotică, antiinflamatoare, și astfel produsele respective nu valorifică integral tot potențialul curativ pe care îl au glicozaminoglicanii. 13  
15

Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve prezenta invenție este aceea de a se obține un amestec de glicozaminoglicani ce se pot condiționa pentru uz uman sau veterinar, având o gamă mult mai largă de acțiuni terapeutice, cu proprietăți restitutive tisulare, antiproliferative, biostimulatoare, anticoagulante, antitrombotice, antilipemice, antiaterosclerotice, antiinflamatoare, asigurând totodată și restructurarea componentelor macromoleculare din țesuturile conjunctiv, cartilagos și osos. 17  
19  
21

Soluția propusă în invenție constă într-un procedeu de obținere a unor glicozaminoglicani cu un conținut de 45...50% condroitin sulfat, dermatan sulfat și keratan sulfat, 30...35% acid hialuronic și 10...15% heparinoizi: heparină și heparansulfat, precum și minimum 7% sulf și minimum 3% azot. 23  
25

Astfel invenția se referă la un procedeu de obținere a unor glicozaminoglicani, în care se amestecă cu apă distilată în raport 1:5 m/v organismele marine animale sau țesuturile animale conjunctive și cartilagineoase precum trahee, cordoane ombilicale, cornee, aorte, toate tocate mărunț, după care se aduce la  $pH = 4,5...5$  cu HCl 1N, se încălzește până la fierbere, se răcește la  $70^{\circ}C$ , se adaugă NaOH 1N până la  $pH = 6,8$ , se amestecă continuu, lent, timp de 2 h, se aduce la  $pH = 8$  cu NaOH 1N și se menține la  $70^{\circ}C$  timp de 1 h, apoi se sifonează, pentru obținerea supernatantului care se colectează, se continuă cu 3 extracții succesive cu apă distilată, în raporturile 1:3, 1:2, 1:1, la  $70^{\circ}C$  și  $pH = 8$ , apoi se concentrează extractele reunite, sub vid, la  $70^{\circ}C$ , până la 1:10 din materia primă folosită la extracție, la extractul concentrat se adaugă în raport 1:100 un preparat enzimatic digestiv, de tip pancreatină, ce conține enzime proteolitice, lipolitice și amilolitice, în principal pentru a hidroliza legăturile existente între glicozaminoglicani și proteine, și, totodată, pentru digestia glicogenului și a lipidelor complexe, digestia enzimatică se efectuează la  $pH = 7,5...8$  cu NaOH 1N, la  $37...40^{\circ}C$ , timp de 48 h, apoi se filtrează și se concentrează sub vid, la  $70^{\circ}C$ , în raport de concentrare 1:4...1:6, se dializează apoi la maximum  $5^{\circ}C$  față de apa curentă, timp de 96 h, până când nu se mai identifică în apa respectivă prezența aminoacizilor, dializatului se filtrează, se concentrează la volumul inițial, de dinainte de dializă, iar pentru precipitarea proteinelor nehidrolizate se adaugă o soluție de concentrație 50% acid tricloracetic, până la atingerea concentrației de 10% acid tricloracetic în amestec, se lasă în repaus la  $5^{\circ}C$  timp de 24 h, se filtrează și, pentru precipitarea glicozaminoglicanilor la filtrat, se adaugă de 1...3 ori în raport 5:1 v/v acetonă și se menține 24 h la  $5^{\circ}C$ , apoi glicozaminoglicanii precipitați se filtrează și se usucă în curent de aer cald la  $50...70^{\circ}C$ , rezultând masa uscată de glicozaminoglicani. 27  
29  
31  
33  
35  
37  
39  
41  
43  
45  
47

# RO 125098 B1

1 Substanța uscată este de 95...98%. Acești glicozaminoglicani au acțiune restitativ  
tisulară, antiproliferativă, biostimulatoare, anticoagulantă, antitrombotică, antilipemică,  
3 antiaterosclerotică, antiinflamatoare, asigurând totodată și restructurarea componentelor  
macromoleculare din țesuturile conjunctiv, cartilajinos și osos, pentru uz uman sau veterinar.

5 Procedul de obținere a unor glicozaminoglicani conform invenției de față prezintă  
următoarele avantaje, datorate grupelor de acțiuni terapeutice ale glicozaminoglicanilor,  
7 expuse mai jos:

9 I. anticoagulantă, antitrombotică, antilipemică și antiaterosclerotică, în principal  
datorită heparinei și heparan sulfatului, care acționează ca anticoagulanți ai sângelui, fiind  
în același timp și agenți antilipemici;

11 II. prevenirea dezorganizării structurale macromoleculare pentru buna funcționare a  
matricei extracelulare, organizarea structurală a proteoglicanilor, precum și hidratarea  
13 avansată a acestor molecule, care formează geluri, chiar la concentrații mici, ușurând  
migrarea moleculelor hidrosolubile în mediul extracelular;

15 III. asigură restructurarea componentelor macromoleculare din țesuturile conjunctiv,  
cartilajinos și osos:

17 1) intră în constituția substanței fundamentale a țesutului conjunctiv, căruia îi conferă  
consistență și flexibilitate;

19 2) conferă rezistență mecanică și elasticitate țesuturilor în asociere cu colagenul și  
elastina;

21 3) intră în structura cartilajelor și au rol în cimentarea țesuturilor;

23 4) acționează ca agenți de lubrifiere la nivelul articulațiilor;

25 5) au rol în menținerea constanței lichidelor oculare;

27 6) protejează mucoasele tubului digestiv de acțiunea mecanică a unor alimente,  
precum și de acțiunea enzimelor proteolitice;

29 7) prezintă eficiență în profilaxia și tratamentul osteoporozei prin transportul și fixarea  
calciului;

31 IV. antivirală și antimicrobiană, constituind o barieră contra pătrunderii în organism  
a microbilor și a toxinelor bacteriene;

33 V. antiinflamatorie, tisular restitativă, antiproliferativă etc.

35 În baza acestor acțiuni terapeutice, glicozaminoglicanii obținuți conform invenției au  
fost condiționați sub forma unor noi produse medicamentoase de uz uman și/sau veterinar,  
37 precum: soluție injectabilă și buvabilă, capsule, gel, destinate unor noi aplicații terapeutice,  
față de cele cunoscute până în prezent.

39 În figuri sunt redată următoarele aspecte:

41 - fig. 1, activitatea enzimatică a MMP12 în prezența biocomplexelor de glicozamino-  
glicani;

43 - fig. 2, efectul GAG asupra viabilității celulare (exprimate prin reducerea MTS) și  
acțiunea citotoxică (exprimată prin eliberarea de LDH);

45 - fig. 3 a, b, c, inducerea apoptozei de către extractele bioactive;

- fig. 4 a, b, c, influența extractelor bioactive asupra inducerii apoptozei în linia celulară  
leucemică Jurkat;

- fig. 5, modularea fazei S de sinteză a celulelor tumorale de către extractele testate;

- fig. 6, influența complexelor bioactive asupra statusului oxidativ celular.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției.

# RO 125098 B1

## Exemplul 1

### *Procedeu de obținere a glicozaminoglicanilor*

Se amestecă 1 kg pește marin, mărunț tocat, cu 5 l apă distilată, se aduce la pH = 5 cu HCl 1N, după care amestecul se încălzește la fierbere. După răcire la 70°C se adaugă soluție NaOH 1N, pentru aducerea la pH = 6,8, se amestecă lent continuu, timp de 2 h, se aduce la pH = 8, cu NaOH 1N, și se menține la 70°C timp de 1 h. Se sifonează pentru obținerea supernatantului care se colectează, și apoi se continuă cu 3 extracții succesive, la 70°C și pH = 8, cu apă distilată în raporturile 1:3, 1:2, 1:1.

Se reunesc extractele și se concentrează sub vid la 70°C, până la raportul 1:10 față de materia primă folosită la extracție. La extractul concentrat se adaugă în raport 1:100 preparat enzimatic digestiv de tip pancreatică, ce conține enzime proteolitice, lipolitice și amilolitice (de tip Triferment), pentru a hidroliza legăturile existente între glicozaminoglicani și proteine, și, totodată, pentru digestia glicogenului și a lipidelor complexe. Digestia enzimatică se efectuează la pH = 8 cu NaOH 1N, la 38°C, timp de 48 h. Soluția hidrolizată se filtrează și se concentrează sub vid la 70°C, în raportul 1:4, apoi se dializează la maximum 5°C față de apa curentă, timp de 96 h, până când nu se mai identifică în apa respectivă prezența aminoacizilor, care se determină printr-o reacție de identificare cu ninhidrină. Dializatul se filtrează, se concentrează la volumul inițial de dinainte de dializă, iar pentru precipitarea proteinelor nehidrolizate, se adaugă o soluție de concentrație 50% acid tricloracetic, până la atingerea concentrației de 10% acid tricloracetic în amestec. Se lasă în repaus la 5°C timp de 24 h, se filtrează, se adaugă peste filtrat acetonă în raport 5:1 v/v și se menține 24 h la 5°C. Apoi glicozaminoglicanii precipitați se filtrează și se usucă în curent de aer cald la 60°C, rezultând masa uscată de glicozaminoglicani.

Glicozaminoglicanii obținuți se caracterizează printr-un conținut de: 49% condroitin sulfat, dermatan sulfat și keratan sulfat, 33% acid hialuronic și 12% heparinoizi (heparină și heparan sulfat). Acest amestec conține 7,5% sulf și 3,5% azot. Substanța uscată este de 96%.

Identificarea și dozarea glicozaminoglicanilor obținuți s-a realizat conform metodelor US Pharmacopoeia 30, prin electroforeza orizontală pe folie de acetat de celuloză, respectiv, titrare automată cu senzor fototrodă.

## Exemplul 2

### *Studii privind activitatea biologică și farmacologică a biocomplexelor pe bază de glicozaminoglicani*

În studiile tehnologice efectuate în vederea obținerii unui complex bioactiv cu conținut ridicat în glicozaminoglicani, au fost izolate și extracte intermediare, cu grade diferite de purificare, ce au fost testate din punct de vedere fizico-chimic, biologic și farmacologic. Astfel, pe lângă glicozaminoglicanii revendicați în prezenta CBI, cu un conținut de 45...50% condroitin sulfat, dermatan sulfat și keratan sulfat, 30...35% acid hialuronic și 10...15% heparinoizi (codificat GAG), au fost testate și extracte alcătuite din glicozaminoglicani minimum 60%, aminoacizi 3,5÷12% (din care aminoacizi esențiali 2÷6,5%: valina, leucina, izoleucina, treonina, metionina, lizina, fenilalanina, triptofan), acizi grași polinesaturați 1÷2% (din care acizi grași esențiali: acid linoleic, acid arahidonic), vitamine (mezoinozitol), glicerofosfați, creatinină, săruri minerale (calciu, potasiu, fier, magneziu, seleniu, nichel, cupru, siliciu) (codificate E4V1 și E4V2).

Prin teste *in vitro* și *in vivo*, a fost investigată intervenția biocomplexelor la nivelul:

- enzimelor degradative, de tipul hialuronidazei, collagenazei, elastazei;
- formării fibrelor de collagen;
- viabilității celulare;
- statusului oxidativ în sisteme aceluare și celulare;
- proceselor inflamatorii;
- leziunilor hepatice induse experimental.

# RO 125098 B1

## 1 *Determinarea acțiunii antihialuronidazice*

În procesele degenerative, mucopolizaharidele acide, glicozaminoglicanii (acidul hialuronic și condroitinsulfații legați de proteine) sunt intens depolimerizate de hialuronidază, distrugându-se astfel substanța fundamentală a țesutului conjunctiv, "liantul tisular", "cimentul intercelular". În stare de sănătate, procesul de proliferare este controlat de prezența în țesuturi și sânge a unei substanțe numite inhibitor fiziologic de hialuronidază (PHI), care scade drastic în bolile degenerative.

Considerând că proliferarea celulară depinde de depolimerizarea substanței fundamentale de către hialuronidaza celulară, rezultă două căi de control terapeutic al bolilor în care proliferarea celulară excesivă este o trăsătură caracteristică:

11 1. creșterea rezistenței substanței fundamentale la depolimerizarea enzimatică, sau regenerarea substanței fundamentale prin administrarea de profactori necesari biogenezei mucopoliglucidelor (glicozaminoglicanilor) și a proteoglicanilor, deci a acidului hialuronic și condroitinsulfaților;

15 2. neutralizarea directă a hialuronidazei celulare, prin scăderea producerii sale de către celule, sau prin inhibarea acțiunii sale depolimerizante, care oferă posibilități terapeutice mai rapide.

19 Evaluarea influenței complexelor bioactive pe bază de glicozaminoglicani asupra activității enzimatică a hialuronidazei s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică cu N-acetilglucozamină. Acidul hialuronic este scindat în prezența hialuronidazei, punând în libertate resturi de N-acetil-glucozamină ce sunt evidențiate spectrofotometric, la lungimea de undă 21 585 nm. Rezultatele, prezentate în tabelul 1, evidențiază faptul că, prin acțiunea puternică de inhibare a hialuronidazei, GAG previn dezorganizarea matricei extracelulare, exercitând o puternică acțiune antiproliferativă.

25

*Tabelul 1*

27 *Activitatea antihialuronidazică a biocomplexelor de glicozaminoglicani*

Substanța	Concentrație (μg/ml)	Activitate enzimatică	% inhibiție
Extract E4V2	5	1,827 ± 0,020	4,7
	10	1,614 ± 0,005*	12,8
	20	1,210 ± 0,011*	27,1
	40	0,711 ± 0,009*	51,3
	80	0,266 ± 0,008*	61,8
Extract GAG	5	1,684 ± 0,017	10,6
	10	1,582 ± 0,012*	15,8
	20	1,109 ± 0,009*	34,2
	40	0,392 ± 0,008*	79,1
	80	0,150 ± 0,006*	92,4
Fără compuși biologici activi	-	1,887 ± 0,006	-

45 \*p<0,05 (vs. control)



## Determinarea activității metaloproteinazelor din matrixul extracelular

Metaloproteinazele din matricea extracelulară joacă un rol important în remodelarea tisulară asociată diferitelor procese fiziologice sau patologice, precum: morfogeneza, angiogeneza, repararea țesuturilor, ciroză, artrită și metastaze [Martel-Pelletier și colab., 2001].

### a. Determinarea activității collagenazei (MMP1)

Colagenul este degradat *in vivo* și *in vitro* de către enzime specifice, denumite collagenaze, considerate la început de origine bacteriană (*Clostridium*), și identificate ulterior în țesuturile animale și umane produse de celulele epiteliale și endoteliale.

Tabelul 2

Activitatea de inhibare a collagenazei (MMP1)

Proba testată	Concentrație (μg/ml)	Activitate enzimatică (unități/mg proteină)	% inhibiție
Extract E4V2	40	1,205 ± 0,005**	26,81
	80	1,122 ± 0,004**	31,85
Extract GAG	40	1,033 ± 0,005**	37,14
	80	0,992 ± 0,005**	40,01
Fără compuși biologici activi	-	1,648 ± 0,007	-

Activitatea enzimatică a collagenazei a fost determinată printr-o metodă spectrofotometrică continuă, ce utilizează ca substrat 2-furanacryloyl-L-leucylglycyl-L-prolyl-L-alanine (FALGPA, substrat specific collagenazei). Protocolul presupune măsurarea scăderii absorbanței substratului la 345 nm (maximum de absorbție a FALGPA).

### b. Determinarea activității elastazei (MMPI 2)

Elastaza secretată de pancreasul exocrin degradează specific fibrele elastice din artere și tendoane, diminuând proprietățile elastice și termoelastice ale acestora. Activarea acestei elastaze este un punct critic în distrugerea matricei extracelulare reprezentată de colagen fibrilar și nefibrilar, fibronectină și laminină, elastină (Ishiguro și colab. 2001); de asemenea, această enzimă procesează angiostatina și TNF-α, fiind implicată în procese cum ar fi vindecarea plăgilor, angiogeneza, apoptoza, dar și în boli cum ar fi scleroza multiplă, artrita, ateroscleroza, cancer și metastaze.

Evaluarea activității acestei enzime în prezența biocomplexelor de glicozaminoglicani s-a făcut utilizând peptida 7-metoxicumarin-4-acetyl-Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-L-α, β-diamino-propionil (2,4 dinitrofenil) amida.

Rezultatele prezentate în fig. 1 ne arată că cele două extracte pe bază de glicozaminoglicani (E4V2 și GAG) în concentrații de 20÷100 μg/ml inhibă semnificativ activitatea collagenazei și elastazei.

### Formarea fibrelor de colagen

Formarea fibrelor de colagen este un proces de autoasamblare ce poate fi modulată de o varietate de macromolecule ce includ: anumiți glicozaminoglicani, proteoglicani și glicoproteine. Acestea modulează cinetica asamblării, precum și diametrul fibrelor de colagen formate.

# RO 125098 B1

Pentru testare, a fost ales un model experimental *in vitro*, realizat în medii acelulare, ce reproduce procesul de formare a fibrilelor de colagen morfologic identic cu cel sintetizat în culturile de țesuturi (Kvist, 2006, Salchert, 2004). Pentru evidențierea oricărui efect asupra matrixului de colagen, se monitorizează creșterea turbidității soluției de colagen în prezența substanțelor investigate.

Tabelul 3

	Durata de monitorizare [minute]			
	360		800	
Temperatura [°C]	26	37	26	37
Apa ( $\Delta A$ )	0,003	0,004	0,009	0,025
Vitamina C ( $\Delta A$ )	0,009	0,020	0,018	0,074
GAG ( $\Delta A$ )	0,005	0,013	0,042	0,080

Rezultatele testului au evidențiat faptul că formarea fibrilelor de colagen este un proces dependent atât de temperatură, cât și de concentrația de complex bioactiv (GAG) din sistem. Totodată, creșterea concentrației de extract în mediul testat influențează în mod favorabil formarea fibrilelor de colagen, efectul fiind cu mult mai mare decât cel produs de vitamina C - cunoscută ca potențator al acestui proces.

#### *Determinarea acțiunii antioxidante in vitro*

Metoda spectrofotometrică indirectă de evaluare a activității antioxidante totale utilizând DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ca sistem de generare a radicalului liber stabil, presupune măsurarea scăderii absorbânței la lungimea de undă 517 nm (maximum de absorbție a DPPH-ului), ce este proporțională cu concentrația de radicali liberi, reduși din soluție. Gradul activității de reducere a radicalului în prezența antioxidantului este calculat ca procent de inhibiție, determinându-se valoarea EC50 (tabelul 4).

Tabelul 4

#### *Influența complexelor bioactive asupra DPPH*

	mg/ml	E4V1		E4V2		GAG	
		Absorbantă	% inhibiție	Absorbantă	% inhibiție	Absorbantă	% inhibiție
Proba 1	0,006	0,390	4,263	0,402	0,618	0,361	14,516
Proba 2	0,013	0,386	5,062	0,395	2,349	0,289	31,365
Proba 3	0,02	0,374	8,023	0,687	4,425	0,240	43,168
Proba 4	0,036	0,378	10,466	0,380	9,957	0,120	71,584
Proba 5	0,119	0,334	20,921	0,352	16,682	0,011	97,395
EC50		0,381		0,553		0,037	

Având în vedere faptul că vitamina C, cunoscută fiind ca un antioxidant puternic, prezintă valoarea EC50 = 10  $\mu\text{g/ml}$ , extractele E4V1, E4V2 prezintă activitate antioxidantă moderată, iar extractul GAG (EC50 = 37  $\mu\text{g/ml}$ ) are o activitate puternic antioxidantă.

# RO 125098 B1

<i>Teste in vitro în sisteme celulare</i>	1
Realizarea acestor teste s-a efectuat pe material biologic constând din linia celulară standardizată HUVEC.	3
HUVEC sunt celulele endoteliale normale din vena ombilicală umană, utilizate la studii de transport macromolecular, coagularea sângelui, fibrinoliză; sunt responsabile de stimularea citokinelor la exprimarea moleculelor de adeziune celulară.	5
<i>a. Determinarea viabilității celulare prin teste de citotoxicitate (MTS și LDH)</i>	7
Distrugerea celulară este inevitabilă ca rezultat al pierderii abilității celulei de a menține și asigura energie pentru activitatea metabolică a funcției și creșterii celulei. Estimarea activității metabolice celulare se bazează pe activitatea mitocondrială. Pentru aceasta, celulele sunt incubate cu un substrat colorat (MTS, MTT), utilizând kit-ul CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. LDH este o enzimă citosolică stabilă eliberată în celulă în condiții de stres (toxicitate a mediului de cultură). În condiții de liză celulară, aceasta se regăsește în supernatantul de cultură. Concentrația ei se măsoară spectrofotometric, ca urmare a unei reacții de conversie a unei sări de tetrazoliu (MTS) într-un compus de tip formazan, de culoare roșie. Conversia MTS în formazanul solubil în apă are loc sub acțiunea enzimelor (dehidrogenaze) care se găsesc în celulele metabolice active. Cantitatea de formazan produsă, măsurată ca absorbantă la 490 nm, este direct proporțională cu numărul de celule vii din cultură. Din moment ce aceste celule care proliferază sunt mai active decât cele care nu proliferază, metodele sunt potrivite nu numai pentru determinarea viabilității celulare și citotoxicitatea factomediata, ci și pentru determinarea activării și proliferării celulare.	9 11 13 15 17 19 21
Evaluarea citotoxicității extractelor obținute, în vederea investigării intervenției acestora asupra statusului oxidativ celular, utilizând linia celulară HUVEC, a evidențiat următoarele aspecte (fig. 2): concentrațiile succesive de GAG (1/500, 1/1000, 1/1500) sunt bine tolerate de linia celulară HUVEC, după 48 h de cultivare, cele 2 teste de citotoxicitate utilizate demonstrând o comportare similară matorului de cultură.	23 25 27
Testele de acțiune specifică (inducerea apoptozei și modularea ciclului celular în linia standardizată de limfoblaste T leucemice umane - Jurkat) evidențiază următoarele aspecte (fig. 3 a, b, c):	29
- apoptoza timpurie este indusă cu precădere de către E4V1 (substanța 1) în raport invers proporțional doză/efect, și de către E4V2 (substanța 2) în maniera doză efect;	31
- apoptoza târzie este indusă preponderent de către complexul E4V1 (substanța 1), confirmând datele de citotoxicitate obținute anterior, urmată de GAG. Complexul E4V2 (substanța 2) prezintă valori apropiate de cele mator;	33 35
- necroza este determinată cu preponderență de E4V1 (substanța 1), în proporție semnificativă, corelată cu diluțiile utilizate. Complexul E4V2 (substanța 2) are procente similare cu matorul, demonstrând încă o dată caracterul netoxic al acestuia. Creșterea procentului de celule necrozate nu este semnificativă în raport cu matorul;	37 39
- se remarcă acțiunea extractului E4V2 (substanța 2) care induce apoptoza timpurie într-o manieră doză-efect în linia leucemică standardizată - Jurkat, fără a fi toxică la nivel de celulă;	41
- E4V1 (substanța 1) are un caracter toxic, iar GAG nu are o influență semnificativă asupra inducerii apoptozei în linia celulară JURKAT (fig. 4 a, b, c);	43
- modularea fazei S de sinteză a celulelor tumorale este decisivă în testarea unor compuși cu potențială acțiune anti-neoplazică. Astfel, E4V1 (substanța 1) și GAG se dovedesc active în acest sens, în special la diluția 1/500 (fig. 5). În concluzie, corelând rezultatele testelor de citotoxicitate și acțiune specifică, s-au demonstrat următoarele efecte:	45 47
- GAG este o substanță lipsită de toxicitate, dar fără efecte marcante de inducere a apoptozei; în schimb produce scăderea ratei de sinteză ADN, în special în diluția 1/500;	49

# RO 125098 B1

1 - ca acțiune terapeutică, se recomandă atât GAG 1/500 pentru reducerea fazei de  
sinteză celulară, cât și E4V2 1/500 pentru inducerea apoptozei timpurii, ambele fiind lipsite  
3 de toxicitate.

## b. Determinarea statusului oxidativ celular

5 Testele s-au axat pe determinarea prin citometrie în flux a stresului oxidativ celular  
exprimat în apă oxigenată eliberată intracelular, prin marcarea fluorescentă cu dihi-  
7 drorhodamină. S-au analizat celulele endoteliale din linia standardizată HUVEC, atât în privința  
nivelului intracelular de apă oxigenată în celulele nestimulate, cât și pentru celulele stimulate cu  
9 TNF- $\alpha$ , un promotor clasic de inflamație.

11 Astfel, rezultatele obținute în cadrul testului evidențiază influența complexelor  
bioactive pe bază de glicozaminoglicani asupra stresului oxidativ celular. După cum se  
observă din fig. 6, diminuarea stresului oxidativ a fost influențată atât de compoziția  
13 extractelor, cât și de concentrația lor în mediu. Se observă că extractele E4V1 și E4V2 în  
concentrații de 1/1000 induc o diminuare a stresului oxidativ comparabilă cu cea indusă de  
15 diclofenac.

## Testarea acțiunii antiinflamatorii

17 Stabilirea acțiunii antiinflamatorii s-a realizat prin evaluarea inhibiției edemului labei  
de șobolan indus de o soluție de caragenină 2% (Winter și colab., 1962). Experimentul a  
19 fost realizat pe șobolani albi Wistar, masculi cu greutatea de 80...100 g. Animalele au fost  
ținute la post (cu apă) cu 12 h înainte de testare, au fost individualizate prin semne colorate  
21 și repartizate în loturi (6 șobolani/lot) după cum urmează:

- 23 - lot martor - animalelor li s-a administrat ser fiziologic și agentul flogistic;
- 25 - lot martor - pozitiv - animalelor li s-a administrat diclofenac sodic (50 mg/kg g.c.) și  
agentul flogistic;
- 27 - lot tratat - animalelor li s-a administrat substanța de cercetat (750 mg/kg g.c.) și  
agentul flogistic.

29 Soluțiile (cu excepția agentului flogistic) s-au administrat intraperitoneal (i.p.), în  
cantitate de 1 ml/kg g.c. S-a măsurat la toate animalele volumul inițial al labei posterioare  
drepte, prin determinare pletismometrică, după care s-a administrat i.p. serul fiziologic,  
31 substanța de cercetat și, respectiv, diclofenac (antiinflamator de referință). După 30 min,  
animalelor li s-a administrat intra-plantar 0,1 ml soluție de caragenină 2%. S-au făcut  
determinări pletismometrice (măsurarea volumului labei posterioare drepte) la intervale de  
33 1, 2, 3, 4 și 24 h de la administrarea agentului flogistic.

35 Rezultatele obținute (tabelul 5) evidențiază faptul că extractul testat manifestă acțiune  
antiinflamatorie (81,4% la 24 h), comportându-se asemănător cu diclofenacul (83,7%).  
Acesta face parte din clasa antiinflamatoarelor nesteroidiene care exercită acțiuni complexe  
37 asupra procesului inflamator: interferează cu sinteza prostaglandinelor, au acțiune  
antihialuronidazică, diminuează formarea și acțiunea unor peptide (bradikinina).

Tabelul 5

41 *Efectul antiinflamator al extractului GAG asupra edemului labei de șobolan  
indus experimental*

Tratament	Efect antiinflamator (%)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
Diclofenac	-	19,7	67,5	66,1	83,65
Extract GAG	-	13,1	59,8	67,4	81,4

# RO 125098 B1

<i>Testarea activității hepatoprotectoare</i>	1
Intervenția complexului bioactiv pe bază de glicozaminoglicani (GAG) asupra peroxidării lipidice și activității enzimatică a catalazei a fost evaluată atât în condiții normale, cât și în condiții de stres oxidativ indus prin administrare de tetraclorură de carbon (CCl <sub>4</sub> ).	3
În cadrul testului au fost utilizați șobolani Wistar masculi, cu o greutate medie de aproximativ 200 g. Animalele au fost ținute în condiții de climă controlate, cu un ciclu lumină-întuneric de 12 h, și au primit hrană standard pentru rozătoare și apă <i>ad libitum</i> .	5
Inducerea experimentală a stresului oxidativ a fost realizată prin administrarea intra peritoneală de CCl <sub>4</sub> sub formă de soluție 50% în ulei vegetal, în doză de 1 ml/kg greutate corporală.	7
Substanțele testate au fost preparate sub formă de soluții injectabile în ser fiziologic, și au fost administrate intraperitoneal în volum de 1 ml/kg.	9
Șobolanii au fost împărțiți în loturi de câte 12 animale, după cum urmează:	11
- Lot 1 - șobolani martor tratați cu ser fiziologic 1 ml/kg g.c., i.p. (MS);	13
- Lot 2 - șobolani tratați cu complex bioactiv pe bază de glicozaminoglicani în doză de 25 mg/kg g.c. (GAGdm);	15
- Lot 3 - șobolani tratați cu complex bioactiv pe bază de glicozaminoglicani în doză de 50 mg/kg g.c. (GAGDM);	17
- Lot 4 - șobolani tratați cu Arginină soluție injectabilă în doză de 50 mg/ml/kg g.c. (Hep).	19
Pentru a putea urmări efectul administrării substanțelor testate atât în condiții normale, cât și în condiții de stres oxidativ indus la nivel hepatic, tratamentul a fost efectuat timp de 10 zile consecutive, după care jumătate din efectivul de animale a fost sacrificată. Celelalte animale au primit, în cea de-a 11-a zi, CCl <sub>4</sub> și, la o oră după administrarea acesteia, au continuat tratamentul cu produsele investigate, timp de încă șapte zile.	21
Evaluarea toxicității induse la nivelul ficatului a fost realizată atât prin cuantificarea statusului peroxidării lipidice (prin dozarea malondialdehidei, MDA) și a activității enzimatică a catalazei în omogenate totale, cât și prin examinarea histopatologică a țesutului hepatic.	23
Rezultatele testelor privind intervenția GAG la nivel hepatic, în condiții normale și de stres oxidativ, au evidențiat următoarele aspecte (tabelul 6):	25
- în condiții normale (înaintea administrării de CCl <sub>4</sub> ), GAG induce o diminuare a statusului peroxidării lipidice, într-o manieră doză-efect, fiind semnificativă în cazul administrării unei doze de 50 mg GAG /kg g.c. ( $p < 0,001$ vs. martor), comparabilă cu cea indusă de arginină perfuzabilă;	29
- scăderea conținutului de MDA este evidențiată și în cazul animalelor care au fost intoxicate cu tetraclorură de carbon, remarcându-se efectul superior al GAG 50 mg/kg g.c. ( $p < 0,001$ vs. martor) comparativ cu arginină ( $p < 0,05$ vs. martor);	31
- în ceea ce privește activitatea enzimatică a catalazei din ficatul de șobolan, administrarea de GAG induce o stimulare semnificativă a acesteia, dependentă de doză; acesta este efectul maxim în cazul loturilor tratate cu GAG 50 mg/kg g.c. ( $p < 0,001$ vs. martor) și GAG 25 mg/kg g.c., fiind comparabil cu cel indus de arginină ( $p < 0,001$ vs. martor), atât în condiții normale, cât și de stres oxidativ;	33
- datele obținute demonstrează că există o corelație directă între inhibarea proceselor de peroxidare lipidică și procesul de stimulare a activității catalazei, evidențiind proprietățile antioxidante la nivel hepatic ale glicozaminoglicanilor obținuți conform invenției;	35
- din punct de vedere al aspectului histopatologic, deși nu s-au evidențiat modificări structurale ireversibile, rezultatele obținute arată că protecția maximă a fost oferită de administrarea GAG în doză de 25 mg/kg g.c.	37

*Peroxidarea lipidică și activitatea enzimatică a catalazei din omogenate totale  
de ficat de șobolan*

Tip analiză	Omogenat ficat			
	Peroxidare lipidică		Catalază	
Substanță testată	fără CCl4	cu CCl4	fără CCl4	cu CCl4
Mator	0,7825 ± 0,04750	1,65 ± 0,109	30,10 ± 1,09	10,71 ± 1,13
GAGdm	0,5600 ± 0,0600	1,03 ± 0,179	73,06 ± 2,34**a	100,7 ± 1,33***a
GAG DM	0,2745 ± 0,0155***a	0,505 ± 0,031**a' ***b	160,83 ± 3,29***a	179,65 ± 2,67***a***b
Arginină	0,1045 ± 0,0055***a	0,91 ± 0,024*a	177,90 ± 2,686***a	106,01 ± 3,61 ***a

\*\*\* -  $p < 0.001$ ; \*\* -  $0.001 < p < 0.01$ ; \* -  $0.01 < p < 0.05$ ; a - vs mator, b - vs. GAG dm

Rezultatele testelor efectuate demonstrează faptul că GAG inhibă activitatea hialuronidazei, elastazei și colagenazei - enzime ce intervine în procesele degradative ale țesuturilor conjunctiv, cartilagos și osos, contribuind astfel la refacerea matricei extracelulare, are efect antiproliferativ la nivel de celulă transformată malign (JURKAT), inhibând sinteza ADN în cadrul ciclului de diviziune celulară, și diminuează efectele proceselor oxidative și inflamatoare ce intervin în bolile degenerative (precum osteoartrita) și patologia sistemului cardio-vascular (hiperlipidemii, ateroscleroză).

# RO 125098 B1

## Revendicare

1

Procedeu de obținere a unor glicozaminoglicani, **caracterizat prin aceea că se** 3  
amestecă organismele marine animale sau țesuturile animale conjunctive și cartilajinoase, 5  
precum trahee, cordoane ombilicale, cornee, aorte, toate tocate mărunț, cu apă distilată în 5  
raport de 1:5 m/v, după care amestecul se aduce la  $pH = 4,5..5$  cu HCl 1N, se încălzește 7  
până la fierbere, se răcește la  $70^{\circ}C$ , se adaugă NaOH 1N până la  $pH = 6,8$ , se amestecă 7  
continuu, lent, timp de 2 h, se aduce la  $pH = 8$  cu NaOH 1N, și se menține la  $70^{\circ}C$ , timp de 9  
1 h, apoi se sifonează, pentru obținerea supernatantului care se colectează, se continuă cu 9  
3 extracții succesive cu apă distilată, în raporturile 1:3, 1:2, 1:1, la  $70^{\circ}C$  și  $pH = 8$ , apoi se 11  
concentrează extractele reunite, sub vid, la  $70^{\circ}C$ , până la 1:10 din materia primă folosită la 11  
extracție, la extractul concentrat se adaugă în raport 1:100 un preparat enzimatic digestiv, 13  
de tip pancreatică, ce conține enzime proteolitice, lipolitice și amilolitice, în principal pentru 13  
a hidroliza legăturile existente între glicozamin oglicani și proteine, și, totodată, pentru 15  
digestia glicogenului și a lipidelor complexe, digestia enzimatică se efectuează la  $pH = 7,5$  15  
...8 cu NaOH 1N, la  $37..40^{\circ}C$ , timp de 48 h, apoi se filtrează și se concentrează sub vid, la 17  
 $70^{\circ}C$ , soluția hidrolizată, în raport de concentrare 1:4...1:6, se dializează apoi la minimum 17  
 $5^{\circ}C$  față de apa curentă, timp de 96 h, până când nu se mai identifică în apa respectivă 19  
prezența aminoacizilor, dializatul de filtrează, se concentrează la volumul inițial de dinainte 19  
de dializă, iar pentru precipitarea proteinelor nehidrolizate, se adaugă o soluție de 21  
concentrație 50% acid tricloracetic  $CCl_3COOH$ , până la atingerea concentrației de 10% acid 21  
tricloracetic în amestec, se lasă în repaus la  $5^{\circ}C$ , timp de 24 h, se filtrează și, pentru 23  
precipitarea glicozaminoglicanilor, se adaugă la filtrat acetonă de 1...3 ori, în raport de 23  
5:1 v/v, și se menține 24 h, la  $5^{\circ}C$ , apoi glicozaminoglicanii precipitați se filtrează și se usucă 25  
în curent de aer cald la  $50..70^{\circ}C$ , rezultând o masă uscată de glicozaminoglicani cu un 25  
conținut de 45...50% condroitinsulfați, dermatan sulfat și keratan sulfat, 30...35% acid 27  
hialuronic și 10...15% heparioizi: heparină și heparan sulfat, precum și minimum 7% sulf și 27  
minimum 3% azot.

(51) Int.Cl.

C08H 1/00 (2006.01),

A61K 35/12 (2006.01)

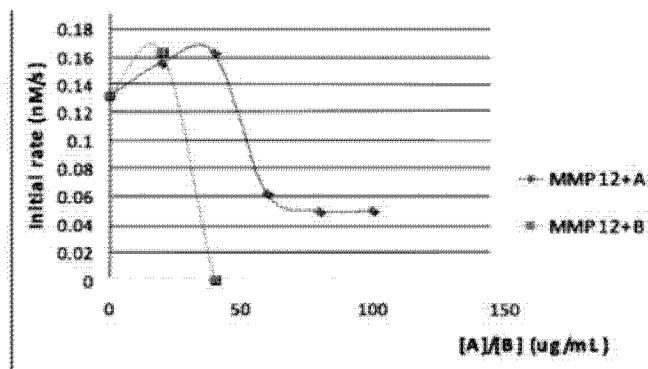


Fig. 1

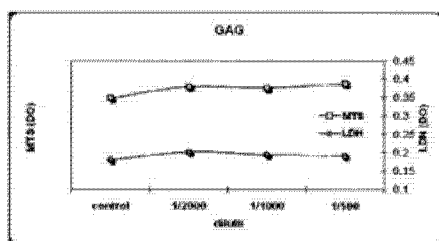


Fig. 2

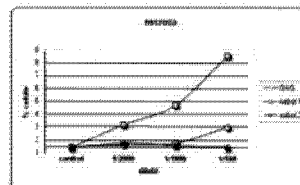
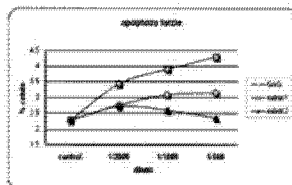
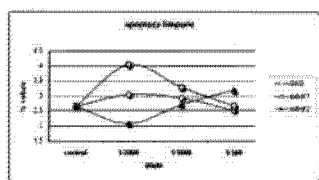


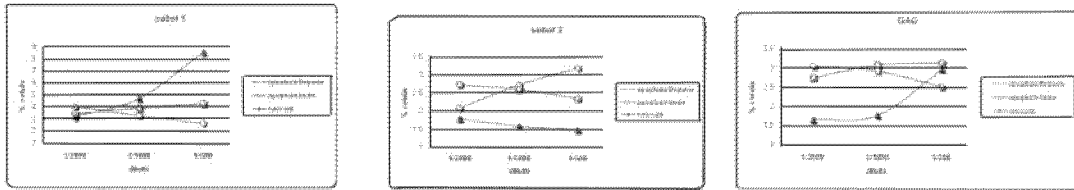
Fig. 3. a, b, c



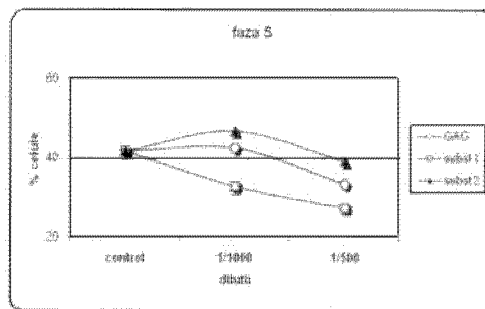
(51) Int.Cl.

**C08H 1/00** (2006.01),

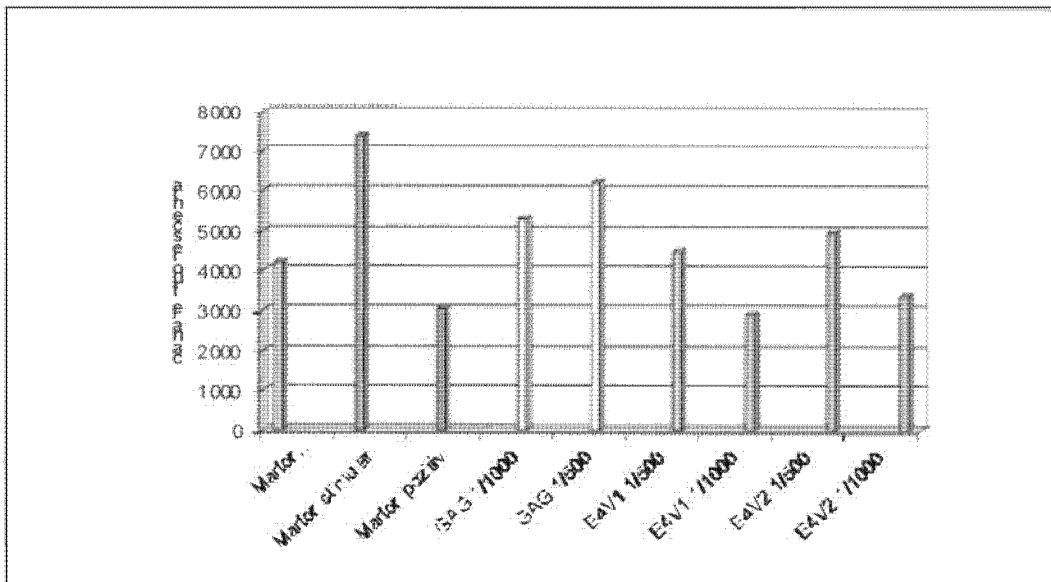
**A61K 35/12** (2006.01)



**Fig. 4. a, b, c**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 563/2016