

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039615**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.17

(51) Int. Cl. **C08B 37/08** (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990091

(22) Дата подачи заявки
2017.07.27

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ НАТРИЕВОЙ СОЛИ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

(31) **102016000079633**

(56) **US-A1-2002120132**
WO-A1-8604355
WO-A1-9218543

(32) **2016.07.28**

(33) **IT**

(43) **2019.05.31**

(86) **PCT/IB2017/054577**

(87) **WO 2018/020458 2018.02.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИДИЯ ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)

(72) Изобретатель:
Питтарелло Мара, Бориле Франческо,
Корса Винченца (IT)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения и очистки натриевой соли гиалуроновой кислоты (НА) из ферментационного бульона *Streptococcus* или *Bacillus*, а также из гребней петухов. Заявленное изобретение обеспечивает получение гиалуроновой кислоты с очень высокой степенью чистоты, поскольку она не содержит провоспалительных и пирогенных компонентов, а также с точной и конкретной молекулярной массой.

039615

B1

039615
B1

Настоящее изобретение относится к способу получения и очистки натриевой соли гиалуроновой кислоты.

Область техники, к которой относится изобретение

Гиалуроновая кислота (НА) представляет собой высокомолекулярный линейный анионный полисахарид, не содержащий сульфатных групп, который состоит из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина.

В природе она присутствует в перикеллюлярной жидкости, в основном веществе соединительной ткани позвоночных организмов (у которых она составляет один из основных компонентов), в синовиальной жидкости суставов, в жидкости стекловидного тела и в пуповине.

Таким образом, НА играет важную роль в биологическом организме, главным образом, в качестве механической поддержки клеток множества тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящи.

Также известно, что НА посредством своих мембранных рецепторов, в частности CD44, CD54 и CD168, модулирует множество различных процессов, относящихся к физиологии и биологии клеток, такие как, например, пролиферация, миграция, клеточная дифференцировка и ангиогенез, и которая также выполняет другие функции, такие как увлажнение кожи и смазывание суставов. Она является абсолютно биосовместимой, и благодаря множеству ее характерных свойств ее широко используют в различных областях, от восстановления тканей до дополнительной терапии, направленной на улучшение вязкости, от дерматологической эстетической медицины до внутриглазной хирургии, от тканевой инженерии до клеточной терапии, а также во многих других.

Физико-химические и биологические свойства НА сильно зависят от ее молекулярной массы (MW), которая варьирует в широких пределах; при этом, в целом, можно утверждать, что средневесовая MW НА находится в диапазоне от приблизительно 20000 до 13×10^6 Да, и это приближение необходимо, поскольку она радикально изменяется в зависимости от источника и способа получения и очистки, используемых для ее выделения.

По сути, существует два основных способа получения НА:

получение из источника животного происхождения: традиционно НА выделяют из тканей животных, таких как пуповина, жидкость стекловидного тела или синовиальная жидкость быка и, главным образом, гребни петухов. Ее получение из источника животного происхождения имеет множество ограничений: оно является дорогостоящим, например, из-за того, что требуется множество этапов для исключения различных типов примесей (начиная с массы органических остатков после расщепления исходной ткани), таким образом, для него требуются этапы, которые обеспечивают инактивацию и устранение любого загрязняющего средства (такого как вирусы), вероятно присутствующего в исходном материале, для него требуется наличие значительных количеств сырьевого материала, и оно не дает больших выходов;

культивирование микроорганизмов: некоторые микроорганизмы, в частности рода *Streptococcus* или *Pasteurella*, стимулированные и/или модифицированные подходящим образом, могут продуцировать НА, которая секретируется в культуральную жидкость, из которой ее выделяют посредством различных способов, известных специалистам в данной области техники. Также в этом случае необходимо множество этапов для устранения присутствующих "примесей", таких как, например, остатки клеточных стенок используемых микроорганизмов, ионы металлов, нуклеиновые кислоты и любые другие нежелательные белковые материалы. Несмотря на эти ограничения, на данный момент он является наиболее развитым и широко используемым способом получения НА. Изучаются новые способы получения НА с помощью биотехнологии, посредством трансфекции генов, экспрессирующих ферменты НА-синтазы, в подходящие клетки-хозяева, такие как некоторые виды *Bacillus* (*Megaterium* и *Sibtilis*) и в *Escherichia coli*. Тем не менее, все процедуры, подходящие для устранения любого потенциально вредного остатка, также необходимы для этих способов получения.

В любом случае, независимо от применяемого способа, ключевым этапом в получении НА очевидно является фаза экстрагирования и очистки полисахарида. Известные способы являются многочисленными и четко сформулированными, которые очевидно скорректированы относительно исходных источников для получения НА. Прежде всего, необходимо исключить остатки источника, следовательно, в случае экстрагирования из ткани животного используют фазы расщепления белков и последующие стадии фильтрации, центрифугирования и промывания; а в случае культивирования обычно используют стадии центрифугирования и последовательного промывания. В любом случае получают жидкую фракцию, из которой выделяют полисахарид. В этом отношении наиболее известной и, несомненно, наиболее широко применяемой процедурой при получении НА из источников животного происхождения, главным образом, является осаждение растворителями: вкратце, увеличивающиеся концентрации органических растворителей (этанол, ацетон) применяют по отношению к жидкой фракции, указанной выше, что вызывает осаждение гиалуроновой кислоты, которую затем очищают посредством последующих стадий растворения и осаждения.

Альтернативная система предусматривает применение четвертичных солей, цетилпиридиния или цетилтриметиламмония с целью образования комплексов с полисахаридом и вызывая его осаждение. Последующие стадии растворения и осаждения снова необходимы перед получением конечного продукта.

При разработке методик также объединялись вышеописанные ключевые стадии с тем, чтобы получить способ, эффективный в отношении выхода и эффективный в отношении чистоты; однако на данный момент по-прежнему существует множество нежелательных явлений, порядка нескольких сотен, о которых сообщали компетентные органы (такие как FDA), которые возникали, в частности, после введения инъекционных фармацевтических композиций на основе НА.

Данный полисахарид применяют в самых различных областях и при различных патологиях: от применений в косметических средствах (путем местного или перорального введения) с увлажняющим действием до местного применения в лечебно-косметических средствах с успокаивающим эффектом, от инъекционных устройств для коррекции дефектов кожи (внутрикожно), будь-то морщин либо шрамов, до более определенных фармакологических применений, таких как внутрисуставное применение при заболеваниях костей и суставов или внутриглазное применение в качестве заменителя жидкости стекловидного тела и т.д.

В случае косметических применений, которые не затрагивают поврежденные ткани, достаточной является НА косметической категории (меньшая степень чистоты), однако очевидно, что в случае фармацевтических применений в инъекционной форме (в частности, по отношению к закрытым полостям, таким как сустав и глаз) необходима степень абсолютной чистоты: присутствие различных типов загрязнителей, таких как нуклеиновые кислоты, и/или белки, и/или остаточные бактериальные токсины клеточных стенок грамположительных бактерий, как, например, липотейхоевая кислота LTA (например, рода *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Staphylococcus*), или грамотрицательных бактерий, как, например, липополисахарид LPS (такой как, например, *Escherichia coli*, *Pasteurella* и *Salmonella*), могут вызывать значительную воспалительную реакцию с последующим высвобождением цитокинов (в частности, TNF и IL-1) как на местном, так и на системном уровне, что будет вызывать генерализованную воспалительную реакцию с последствиями для всего организма, достигая (в большинстве серьезных случаев) форм септического шока, и это объясняет множество сообщений о нежелательных явлениях, указанных выше. LTA и LPS, по сути, являются полимерами, состоящими из липидной части и сахаридной части, способными вызывать сильные иммунные реакции, а в наиболее серьезных случаях - артрит, нефрит, менингит или вызывать лихорадку и шок с осложнениями, которые могут быть даже смертельными.

Также следует принять во внимание, что, как указано ранее, MW НА варьирует в зависимости от источника и способа получения. Более конкретно, MW, указанная в данном документе, относится к среднемолекулярной массе, измеренной с помощью способа "характеристической вязкости". Колебания MW определяют применение НА в различных областях, например, молекулы с низкими значениями MW применяют в дерматологических или лечебно-косметических препаратах (приблизительно 200 кДа; *Connectivine*®), тогда как для внутрисуставных применений предпочтительны более высокие значения молекулярной массы (обычно в диапазоне 700-1800 кДа; *Hyalgan*®, *Hyalubrix*®, *Orthovisc*®) вплоть до значений MW более 1500 кДа при применениях в пластической хирургии или применениях, связанных с внутриглазными манипуляциями. Очень важно точно регулировать MW НА, не только из-за того, что она определяет биологические и физико-химические характеристики полимера, но также поскольку было наглядно продемонстрировано, что НА, имеющая MW ниже 30000 Да, обладает сильным воспалительным эффектом (ЕРО 138572), что абсолютно нежелательно вне зависимости от применения.

Это означает, что в способе получения и очистки НА различные факторы необходимо оценивать и контролировать

выход в способе: выделение максимально возможного количества НА из выбранного источника получения является основополагающим;

точность совокупности стадий очистки: полученный продукт не должен содержать никаких загрязняющих веществ, способных запускать воспалительные процессы;

разделение фракций по MW: необходимо получать требуемую MW и конечно без вызывающих воспаление фракций.

Множество попыток объединения этих требований известны в уровне техники. Среди них можно вкратце упомянуть следующие.

US 5925626: очистка НА из гребней петухов путем осаждения этанолом с образованием двух фракций с конкретной MW (50-100 кДа и 500-730 кДа) без вызывающей воспаление фракции.

EP 535200: очистка НА из гребней петухов путем образования соли с четвертичными аминами и последующим осаждением растворителем (этанолом или ацетоном). Получают НА, имеющую MW в диапазоне от 750 до 1230 кДа, без вызывающих воспаление фракций, и, в частности, предназначенную для офтальмологического применения.

US 6489467: очистка НА из *Streptococcus* путем преднамеренного подкисления с помощью HCl с последующими изменениями значений pH и стадиями диафильтрации с получением НА, имеющей MW приблизительно 1700 кДа.

Choi et al. *Biomaterials Research*, 2014, 18, 1-10: очистка НА из *Streptococcus zooepidemicus* путем диафильтрации и осаждения ацетоном. Получают НА с MW в диапазоне от 900 до 1100 кДа.

EP 2870255: очистка НА из *Streptococcus zooepidemicus* путем стадий фильтрации и ультрафильтра-

ции, изменения значений рН с получением MW в диапазоне 60-2400 кДа и окончательного осаждения этанолом.

Подробное описание изобретения

Объект настоящего изобретения относится к новому способу получения и очистки натриевой соли НА, который обеспечивает ее получение с очень высокой степенью чистоты, поскольку она не содержит загрязняющих веществ, и точной и конкретной MW.

Новый способ очистки гиалуроновой кислоты и ее натриевой соли включает различные стадии, согласованные и последовательные, для очистки НА, полученной, как хорошо известно специалистам в данной области техники, как из биологического источника, в частности из гребней птиц рода Gallus (EP 0138572, далее в данном документе эти гребни будут обозначаться как гребни петухов, несмотря на вид птицы), так и посредством способа ферментации Streptococco, также применимого для НА, получаемой с помощью методик молекулярной инженерии из Bacillus subtilis и Bacillus megaterium (EP 2614088, EP 2614087); этот способ особенно применим для НА, получаемой из ферментационного бульона Streptococcus, еще более предпочтительно из бульона Streptococcus equi подвида equi, 68222, мутант H-1 (EP 0716688). Заявитель продемонстрировал далее в данном документе, как этот способ обеспечивает получение не только натриевой соли НА в соответствии со всеми требованиями в отношении физико-химических характеристик, установленными европейской фармакопеей (монография о НА: Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472), но, в частности, некоторых характеристик по чистоте, при этом показатели, заявленные заявителем, были дополнительно сужены с целью обеспечения гиалуроновой кислоты, имеющей очень высокую степень чистоты, которую можно использовать полностью безопасно, в особенности во всех инъекционных фармацевтических композициях (внутрисуставных, внутрикожных и внутриглазных), поскольку она не содержит никаких провоспалительных и пирогенных компонентов. Натриевую соль НА, очищенную посредством нового способа, являющегося объектом настоящего изобретения, можно также применять в получении всех производных, известных специалистам в данной области техники, таких как, например, ее соли с тяжелыми металлами (EP 0827514), сложные эфиры (EP 0216453), амиды (EP 1095064), сульфонаты (EP 0940410) и продукты, полученные в результате сшивания, в том числе продукты, полученные в результате самосшивания (EP 0341745).

Объект настоящего изобретения также относится к конкретным фазам тепловой обработки НА, которая все еще подлежит очистке, в частности, ферментационного бульона Streptococcus (содержащего эту НА), для получения различных фракций НА, имеющих точную средневесовую MW: заявитель, по сути, усовершенствовал конкретную тепловую обработку в отношении температуры и времени обработки (условий, описанных более подробно ниже), которая следует за фазой инактивации ферментационного бульона или которая происходит одновременно с ферментативным расщеплением гребней петухов, что обеспечивает получение конечного продукта, характеризующегося требуемой характеристической вязкостью. Конкретные значения средневесовой MW НА соответствуют конкретным значениям характеристической вязкости, и эту вязкость рассчитывают согласно описанному в соответствующей монографии о НА в европейской фармакопее согласно способу "характеристической вязкости" (Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472).

Дополнительный объект настоящего изобретения относится к фармацевтическим, косметическим и пищевым композициям, содержащим указанные фракции, более конкретно к

фармацевтическим композициям для внутрисуставного применения, содержащим натриевую соль НА с очень высокой/высокой/средней средневесовой MW, которые предназначены для применения в восстановлении вязкости синовиальной жидкости в пораженных артритом суставах, при травматическом повреждении суставов, при повреждении субхондральной кости;

фармацевтическим композициям для внутриглазного применения или для введения в глаз для лечения заболеваний глаз, содержащим натриевую соль НА с очень высокой/высокой/средней/низкой средневесовой MW;

фармацевтическим композициям, содержащим натриевую соль НА с очень высокой/высокой/средней/низкой средневесовой MW, которые предназначены для применения в предупреждении образования спаек после хирургического вмешательства;

фармацевтическим композициям для местного или инъекционного применения (внутрикожного и/или внутримышечного), содержащим натриевую соль НА с очень высокой/высокой/средней/низкой средневесовой MW, предпочтительно натриевую соль НА со средней/низкой средневесовой MW, в лечении язв на коже, пролежней, ожогов, рубцов и повреждений кожи, в лечении келоидных рубцов или гипертрофических рубцов, следовательно, в лечении всех типов дефектов кожи с неповрежденной или поврежденной кожей, и в качестве средства терапии для лечения заболеваний кожи, таких как формы экземы и различные виды дерматита, в частности атопического дерматита и потницы, псориаза;

фармацевтическим композициям для интравезикального применения, содержащим натриевую соль НА с очень высокой/высокой/средней средневесовой MW, в частности для лечения интерстициального цистита;

фармацевтическим композициям для инъекционного применения, содержащим натриевую соль НА с очень высокой/высокой/средней средневесовой MW в качестве наполнителя в области эстетической

дерматологии или в качестве средства для коррекции фигуры в пластической хирургии;

косметическим композициям для местного и перорального применения;

фармацевтическим или пищевым композициям, содержащим натриевую соль НА с очень высокой/высокой/средней/низкой средневесовой MW, для обработки ротовой полости или пораженных артритом суставов, для трофического питания сухожилий, трофического питания кожи и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта.

Дополнительный объект настоящего изобретения также относится к двух/трехмерным биоматериалам, содержащим производные, полученные из НА, очищенной согласно настоящему изобретению, в форме подушечек, тканых, нетканых материалов, гранул, пленок и гелей, также в возможной ассоциации с клетками различного происхождения и/или компонентами крови, такими как, например, компоненты, полученные из тромбоцитов.

Заявитель совершенствовал следующий способ очистки с основной целью, заключающейся в исключении всех примесей, полученных из выбранного источника получения гиалуроновой кислоты, главным образом представленных белками, нуклеиновыми кислотами и/или другими/различными видами пирогенов. В частности, целью настоящего изобретения является полное удаление бактериальных токсинов, происходящих из грамположительных бактерий, таких как Streptococcus или Bacillus (или из таких бактерий, как, например, Enterococci и Staphylococci), или из грамотрицательных бактерий, таких как, например, Escherichia coli (или Pasteurella и Salmonella), обычно отсутствующих в ферментационных бульонах (если не остаются от штамма-источника), но возможное загрязнение которыми будет представлять очень важную проблему безопасности: присутствие токсинов (таких как LTA или LPS) в конечном продукте НА, по сути, не будет удовлетворять требованиям необходимой степени чистоты, поскольку они могут обуславливать выработку сильных провоспалительных факторов, которые могут вызывать воспаление/инфекцию обработанных суставов или тканей, даже вплоть до их полного разрушения или некроза.

Новый способ очистки натриевой соли НА обеспечивает

высокий выход в способе;

общую чистоту продукта;

получение фракции с требуемой характеристической вязкостью (следовательно, MW).

Способ состоит из двух или трех стадий:

инактивация (эта стадия присутствует только в случае получения НА из ферментационного бульона Bacillus и Streptococcus);

экстрагирование;

очистка.

Инактивация: эта стадия относится к получению НА из Streptococcus (а также из Bacillus), которых культивируют в специальных ферментерах, содержащих подходящие культуральные среды в условиях, известных специалистам в данной области техники; причем этот способ осуществляется с последующей фазой инактивации бактерий путем подкисления культуральной жидкости, предпочтительно с помощью HCl, с целью снижения pH до значения от 4 до 5, при этом значении Streptococcus, по сути, полностью прекращает свою метаболическую активность.

За этим следует тепловая обработка инактивированного бульона путем нагревания (описанного ниже) для получения НА, характеризующейся высокой или средней вязкостью, или с низкой вязкостью; эта обработка не осуществляется в случае получения НА, характеризующейся очень высокой вязкостью. Как указано выше, по сути, конкретные диапазоны MW соответствуют конкретным диапазоном вязкости, и таким образом заявитель разработал способ, который позволяет получать требуемые фракции с абсолютной точностью, как продемонстрировано ниже.

Биомассу удаляют путем фильтрации инактивированного бульона через подушки из целита (диатомовая земля, химическое название: диоксид кремния) с возможной дополнительной последующей фильтрацией через фильтр с тонкостью фильтрации, равной 0,5 мкм (пропиленовые фильтры предпочтительны); бульон предпочтительно нейтрализуют гидроксидом натрия (NaOH) при значении pH 6,5-7,5.

Экстрагирование: эта фаза является общей как для получения НА из Streptococcus и Bacillus, так и для НА, получаемой из гребней петухов; в последнем случае способ согласно настоящему изобретению начинается с использования гомогената, полученного из гребней согласно описанному в EP 0138572. Более конкретно, гомогенат подвергают тепловой обработке путем нагревания (описанного ниже) для получения НА, характеризующейся высокой, или средней, или низкой вязкостью; причем эта тепловая обработка осуществляется одновременно с ферментативным расщеплением (которому подвергают указанный гомогенат, далее в данном документе определяется как гомогенат, подвергнутый ферментативному расщеплению) с использованием фермента папаина, полученного в фосфатном буфере, как известно специалистам в данной области техники. Для неочищенной гиалуроновой кислоты, присутствующей в нейтрализованном фильтрате или присутствующей в смеси продуктов ферментативного расщепления, подвергнутой тепловой обработке (далее в данном документе определяется как среда, содержащая неочищенную НА), затем обеспечивают возможность образования комплекса с СРС (цетилпиридиния хлорид, при этом образуется соль СРС-НА) после дополнительного добавления целита при перемешивании.

Комплексу дают возможность осесть для разделения твердого вещества и жидкой фазы, которую удаляют. НА, присутствующую в твердой фазе, затем растворяют при перемешивании в солевом растворе NaCl и полученный продукт (натриевую соль НА, растворенную в этой среде) подвергают дополнительным стадиям фильтрации/очистки посредством фильтровальных тканей для отделения оставшегося целита и посредством фильтров с тонкостью фильтрации, равной 3 мкм (полипропиленовые фильтры являются предпочтительными), со сбором фильтрата. Эта конкретная процедура определена как "экстрагирование" натриевой соли НА, еще не подвергнутой очистке, и может осуществляться от 1 до 4 раз. После сбора и объединения отфильтрованных продуктов такой "экстрагированный" продукт обрабатывают конкретными смолами ароматического типа, подходящими для абсорбции крупных молекул благодаря радиусу пор в диапазоне от 200 до 300 Å, они, безусловно, вносят вклад в снижение общего содержания примесей в НА, полученной из системы получения, от которой очищали полисахарид, а также от веществ, используемых в вышеуказанном способе. Предпочтительно применяют смолу, состоящую из сшитых полистирольных матриц, причем смола DIAION HP20 (или HP20L) (MITSUBISHI CHEMICAL), как было доказано, является особенно эффективной. Указанная обработка заключается в том, что смолу и экстракт оставляют перемешиваться в течение некоторого периода времени. Полученный продукт затем фильтруют с применением фильтров/тканей, предпочтительно изготовленных из полипропилена (для отделения смол от натриевой соли НА), также возможно применение фильтров с тонкостью фильтрации 3 мкм.

Очистка: этой конечной стадии может предшествовать возможное осаждение натриевой соли НА, полученной в фазе "экстрагирования", в этаноле (эту стадию можно вводить с целью дополнительной очистки полисахарида, в особенности, если его получают из гребней петухов); удаление вышеуказанного растворителя осуществляют с последующим повторным растворением осадка в воде, после чего проводят следующие стадии "очистки": добавление NaOH в воде для полного удаления остаточных токсинов, обеспечение нейтрализации, предпочтительно с помощью HCl (при 37% по весу), до значения pH в диапазоне от 8 до 9 (термин "обеспечение нейтрализации" используется просто в этой фразе для указания намерения заявителя снизить pH до значений, близких к нейтральным), фильтрация предпочтительно посредством фильтров, характеризующихся тонкостью фильтрации 3 мкм, осаждение и, по меньшей мере, промывка этанолом, конечная промывка в органическом растворителе, предпочтительно ацетоне. Натриевую соль НА, полученную и очищенную таким образом, высушивают, как известно специалистам в данной области техники.

Следовательно, объект настоящего изобретения относится к способу получения и очистки натриевой соли НА, далее в документе схематически описанному с помощью его фаз.

А. Инактивация (в случае очистки НА, полученной при ферментации *Streptococcus* и *Bacillus*):

A1) подкисления ферментационного бульона до значения pH 4-5; причем предпочтительно применяют 1н. HCl;

A2) термическая обработка бульона при перемешивании (эту обработку не осуществляют, если получают НА с очень высокой вязкостью);

A3) удаление биомассы посредством фильтрации через подушки из целита (химическое название: диоксид кремния; в количестве от 20 до 60 г/л бульона, предпочтительно 30-40 г/л), возможной дополнительной фильтрации с применением фильтров, характеризующихся тонкостью фильтрации 0,5 мкм, предпочтительно полипропиленовых фильтров;

A4) обеспечение нейтрализации до значения pH 6,5-7,5, предпочтительно с помощью 20% водного раствора NaOH.

В. Экстрагирование

в случае гомогената из гребней соответствующую тепловую обработку сперва осуществляют одновременно с его ферментативным расщеплением и последующей фильтрацией (для удаления нерасщепленного биологического остатка), с последующими следующими общими фазами:

V1) добавление целита (в количестве от 20 до 60 г/л бульона/л продукта ферментативного расщепления, т.е. на литр среды, содержащей неочищенную НА) и обеспечение образования комплекса с цетилпиридиния хлоридом (CPC) (4-20 г/л/л продукта ферментативного расщепления, предпочтительно 5-15 г/л) при перемешивании в течение по меньшей мере 30 мин и последующее осаждение в течение по меньшей мере 30 мин;

V2) удаление жидкой фазы;

V3) растворение НА, присутствующей в твердой фазе, в NaCl (предпочтительно используют 0,3М водный раствор) при перемешивании в течение периода 4-24 ч, фильтрация с применением фильтровальных тканей для отделения остаточного целита и фильтров с тонкостью фильтрации 3 мкм (полипропиленовые фильтры являются предпочтительными) и сбор первого экстракта в виде натриевой соли НА; эту процедуру следует повторять от 1 до 4 раз;

V4) объединение экстрактов;

V5) добавление к объединенным экстрактам смолы ароматического типа (в количестве от 10 до 60 г/л экстракта) с радиусом пор 200-300 Å, причем смола, состоящая из сшитых полистирольных матриц, является предпочтительной, смола DIAION HP20 (или HP20L) является еще более предпочтительной,

причем эту обработку осуществляют при перемешивании в течение по меньшей мере 8 ч;

В6) по меньшей мере, фильтрация с применением фильтровальных тканей (предпочтительно изготовленных из полипропилена) для отделения смол от натриевой соли НА, и возможно, по меньшей мере, фильтрация с применением фильтров с толщиной фильтрации 3 мкм (для этой фильтрации предпочтительными являются полипропиленовые фильтры).

С. Очистка

в случае натриевой соли НА, получаемой из гребней петухов, этой стадии может предшествовать возможное осаждение натриевой соли НА, полученной на предыдущей стадии, в этаноле с удалением вышеуказанного растворителя и повторным растворением осадка в очищенной воде (Евр. Фарм.8.0, 01/2009:0008) с восстановлением исходного объема и последующим выполнением следующих стадий очистки, вне зависимости от выбранного источника:

С1) добавление NaOH (предпочтительно используют 0,2-0,4М раствор) в воде при перемешивании;

С2) обеспечение нейтрализации до значения pH в диапазоне от 8 до 9, предпочтительно с помощью HCl (с концентрацией 37%);

С3) фильтрация, при этом предпочтительным является фильтр с толщиной фильтрации 3 мкм (полипропиленовые фильтры предпочтительны);

С4) осаждение и, по меньшей мере, промывка натриевой соли НА, полученной на стадии С3, с помощью этанола, окончательная промывка в органическом растворителе, предпочтительно ацетоне;

С5) высушивание натриевой соли НА, как известно специалистам в данной области техники, предпочтительно при температуре от 25 до 40°C в течение не менее 15 ч, под вакуумом.

Определение средневесовой MW натриевой соли НА.

Целью тепловой обработки согласно настоящему изобретению является обеспечение получения натриевой соли НА с характеристической вязкостью (IV), которая попадает в конкретные диапазоны (IV, измеренная согласно способу, описанному в Евр. Фарм. 5.0. 01/2005; Евр. Фарм. 1472), который описан в данном документе ниже.

Тепловая обработка НА из ферментационного бульона *Streptococcus* или *Bacillus*

при 60±5°C в течение 5-40 мин: это обеспечивает получение НА с высокой вязкостью и, следовательно, натриевой соли НА, характеризующейся конечной IV в диапазоне 17-24 дл/г; вышеуказанную тепловую обработку предпочтительно выполняют при 65°C в течение 5-30 мин;

при 70±5°C в течение 5-40 мин: это обеспечивает получение НА со средней вязкостью и, следовательно, натриевой соли НА, характеризующейся конечной IV в диапазоне 10-15 дл/г; вышеуказанную тепловую обработку предпочтительно выполняют при 70°C в течение 5-30 мин;

при 90±5°C в течение 150-300 мин: это обеспечивает получение НА с низкой вязкостью и, следовательно, натриевой соли НА, характеризующейся конечной IV в диапазоне 3-6 дл/г.

Если тепловую обработку не осуществляют, конечная IV натриевой соли НА, очищенной согласно объекту настоящего изобретения, равняется 29 дл/г или больше, следовательно, очищенный продукт представляет собой натриевую соль НА, характеризующуюся очень высокой вязкостью.

Тепловая обработка НА из гребней петухов

при 50-60°C в течение 26-30 ч: это обеспечивает получение НА с высокой вязкостью и, следовательно, натриевой соли НА, характеризующейся конечной IV в диапазоне 17-24 дл/г; вышеуказанную тепловую обработку предпочтительно выполняют при 55°C в течение 28 ч;

при 60-65°C в течение 28-30 ч: это обеспечивает получение НА со средней вязкостью и, следовательно, натриевой соли НА, характеризующейся конечной IV в диапазоне 10-15 дл/г; вышеуказанную тепловую обработку предпочтительно выполняют при 60°C в течение 30 ч;

при 65-70°C в течение 46-50 ч: это обеспечивает получение НА с низкой вязкостью и, следовательно, натриевой соли НА, характеризующейся конечной IV в диапазоне 3-6 дл/г; вышеуказанную тепловую обработку предпочтительно выполняют при 65°C в течение 48 ч.

По завершении обработки специалист в данной области техники может собирать образец и проверять полученную вязкость, при этом на основании достигнутого результата он может либо повторять процедуру, либо изменять время и/или температуру обработки (по-прежнему в пределах описанного диапазона) для достижения требуемой вязкости: значения времени обработки и температуры для достижения вышеописанных диапазонов IV зависят, по сути, от концентрации и MW НА, присутствующей в исходном бульоне/продукте расщепления.

Уравнение Марка-Хаувинка (Terbojevich M. et al., Carbohydrate Research, 1986, 149, 363-377; Terbojevich M. et al., Carbohydrate Research, 1986, 157, 269-272) используют для определения соответствующих средних значений MW, уравнение связывает VI с MW. Следовательно, диапазоны вязкости соответствуют конкретным диапазонам MW:

29 дл/г соответствует приблизительно 1885 кДа;

17-24 дл/г соответствует диапазону от приблизительно 920 до 1450 кДа;

10-15 дл/г соответствует диапазону от приблизительно 450 до 780 кДа;

3-6 дл/г соответствует диапазону от приблизительно 90 до 231 кДа.

Путем следующего эксперимента заявитель продемонстрировал эффективность способа, являющегося объектом настоящего изобретения, в отношении чистоты полученной натриевой соли НА.

Очистка натриевой соли НА, полученной из *Streptococcus*.

По завершении процесса ферментации *Streptococcus equi* 68222 мутанта Н-1, культивируемого согласно примеру 3 из EP 0716688, приблизительно 5 л бульона собирают и подвергают загрязнению с помощью *E. coli* ATCC 8739 в количестве 10 бактериальных клеток на 1 мл бульона. Этот бульон затем оставляют в открытом контейнере (с целью содействия дополнительному загрязнению бактериями или дрожжами/грибками, споры которых могут находиться в воздухе) в течение времени не менее 16 ч при комнатной температуре. Его затем делят на два образца: 2,5 л (образец А) подвергают полному способу очистки, являющемуся объектом настоящего изобретения, тогда как оставшиеся 2,5 л (образец В) подвергают простому осаждению, как описано в данном документе ниже. Образец бульона подвергают микробиологическому контролю с помощью качественных и количественных анализов (посредством системы API, осуществляемой согласно Евр. Фарм. 5.0; 2.6.12) присутствующей микробной и/или грибковой нагрузки. Результаты указаны в табл. А.

Образец А: бульон подвергают инактивации путем подкисления до значения pH 4,3 с помощью 1н. HCl и тепловой обработке при 65°C в течение 10 мин при перемешивании. Биомассу удаляют посредством фильтрации через целит (40 г/л) и обеспечивают нейтрализацию до значения pH 6,5 с помощью 20% водного раствора NaOH. За этим следует фаза экстрагирования с добавлением целита (20 г/л бульона) и обеспечением комплексообразования с CPC (10 г/л бульона) при перемешивании в течение 30 мин с последующим осаждением в течение 1 ч; жидкую фазу затем удаляют сифонированием, и НА, присутствующую в твердой фазе, растворяют в 0,3М водном растворе NaCl по-прежнему при перемешивании в течение периода, составляющего 20 ч; этот способ продолжают выполнять посредством осуществления фильтрации через фильтровальную ткань, а также с применением фильтров с тонкостью фильтрации 3 мкм и сбора первого экстракта; эту процедуру повторяют 2 раза и два экстракта объединяют; за этим следуют добавление смолы ароматического типа, DIAION HP20 (40 г/л, эту обработку осуществляют при перемешивании в течение 8 ч), и фильтрация для отделения смол от НА с применением полипропиленовых фильтровальных тканей. Очистку выполняют путем добавления 0,4М NaOH в воде (при перемешивании) и с последующим обеспечением нейтрализации до значения pH 8,5 с помощью HCl (37%) и фильтрацией с применением фильтров из полипропилена с тонкостью фильтрации 3 мкм. Натриевую соль НА осаждают с помощью 100% этанола, промывают 80% этанолом и конечное промывание осуществляют в ацетоне; окончательное высушивание полученной и очищенной натриевой соли НА осуществляют при 25°C в течение 20 ч, под вакуумом.

Образец В: этот образец подвергали инактивации путем подкисления до значения pH 4,3 с помощью 1н. HCl и тепловой обработки при 65°C в течение 10 мин при перемешивании, точно как для образца А. Биомассу удаляли из бульона путем фильтрации через целит, затем фильтрат подвергали осаждению этанолом с высушиванием при 25°C осажденной НА (неочищенной) в течение 20 ч, под вакуумом.

Очищенная НА должна быть апирогенной, т.е. не содержать элементов, которые могут вызывать повышение температуры тела после их введения. Тест для оценки апирогенности можно выполнять различными способами: LAL-тест (для специфического определения *in vitro* эндотоксина LPS, происходящего из грамотрицательных бактерий, согласно требованиям Евр. Фарм. 5.0 монографии, относящейся к гиалуронату натрия), тест на пирогенность (недискриминационный анализ *in vitro* природы пирогенного вещества) и Endosafe®-IPT (тест *in vitro*, отличный от требуемого согласно фармакопее).

LAL-тест: в основе LAL-теста лежит способность амебоцитов, экстрагированных из крови *Limulus polyphemus*, образовывать гель в присутствии бактериальных эндотоксинов из грамотрицательных бактерий, главным образом ответственных за пирогенный эффект. Этот тест выполняют согласно Евр. Фарм. 5.0,2.6.14.

Тест на пирогенность: этот тест представляет наиболее широко применяемый аналитический способ определения присутствия пирогенных веществ, он предусматривает использование кроликов, которым вводят посредством инъекции в вену наружного уха небольшие дозы продукта, при этом исходную температуру проверяют через 3 ч после инъекции. Повышение температуры является признаком пирогенности продукта. Этот тест выполняют согласно Евр. Фарм. 5.0,2.6.8.

Endosafe®-IPT (Charles River Laboratories, Inc.): тест, с помощью которого можно выявлять присутствие пирогенов любого типа, поскольку они могут стимулировать выработку цитокина IL-1 β , который характеризуется сильным провоспалительным эффектом. Этот тест позволяет идентифицировать пирогены как эндотоксического типа (LPS), так и отличного от эндотоксического типа (LTA, и/или белки, и/или пирогенные производные, например, из вирусов или дрожжей/плесени): он состоит из двух стадий, на первой стадии образец инкубируют с кровью человека (если пирогены присутствуют, они стимулируют выработку IL-1 β моноцитами крови), вторая стадия заключается в выявлении присутствия IL-1 β , выполняемом с помощью специфического теста ELISA со считыванием при 450 нм (Schindler S. et al., ALTEX, 2009, 26, 265-277).

Для образцов А и В анализ в отношении пирогенов выполняли с помощью теста на пирогенность и

Endosafe®-IPT, поскольку посредством LAL-теста нельзя оценить возможное присутствие пирогенных веществ, отличных от эндотоксина LPS, тогда как посредством других двух способов обнаруживают пирогены любой природы, пусть даже с различными показателями чувствительности. Тест IPT, по сути, позволяет идентифицировать бактериальные остатки, полученные как из грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, и превосходит тест на пирогенность, если рассматривать чувствительность. Кроме того, IPT более специфичен, чем тест на кроликах, поскольку посредством него оценивают токсичность загрязняющих веществ в ткани человека (Hartung T. et al., ATLA, 2001, 29, 99-123). В обоих образцах также оценивали общее содержание белка, определяемое согласно Евр. Фарм. 5.0, 01/2005; 1472. Результаты тестов показаны в табл. В.

Результаты.

Табл. А: в этой таблице можно наблюдать присутствие важной бактериальной, а также грибковой нагрузки, что касается непатогенных организмов и патогенных организмов, таких как *B. cereus*, *Coli* и *Candida*.

Таблица А

Микробная нагрузка	<i>Bacillus cereus</i>	4,6 x 10 ⁷ /мл
	<i>Streptococcus</i>	2,2 x 10 ⁷ /мл
	<i>E. coli</i>	9,8 x 10 ⁶ /мл
	Общая нагрузка	7,8 x 10⁷/мл
Грибковая нагрузка	Плесень	9,4 x 10 ⁷ /мл
	Дрожжи (<i>Candida lusitanae</i>)	2,5 x 10 ⁷ /мл
	Общая нагрузка	1,2 x 10⁸/мл

Следовательно, в таблице продемонстрирован уровень содержания в специально загрязненном исходном бульоне пирогенных элементов, как из грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, в дополнение к различным видам пирогенов, таких как компоненты, происходящие из *Candida*.

Таблица В

	<i>Тест на пирогенность</i>	ИРТ	Содержание белка
Образец А	0,9°C	N.R.	0,04%
Образец В	4,1°C	>5 EU/мг	10%

NR: не поддающийся выявлению (менее 0,05 EEU/мг).

Эти данные показывают, что посредством нового способа очистки НА можно очищать от различных видов пирогенных веществ.

Из табл. В можно отметить, что тест IPT образца В показывает очень высокое значение пирогенных токсинов, при этом согласно монографии о НА в Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472, для инъекционных введений НА, по сути, допускается максимальный предел эндотоксинов ниже 0,05 МЕ/мг (т.е. 0,05 EU/мг). Следовательно, в образце В концентрация пирогена превышает этот предел по меньшей мере в 100 раз. В случае теста на пирогенность у трех обработанных кроликов эта концентрация вызвала общее повышение температуры на 4,1°C. Согласно Евр. Фарм. 5.0, 2.6.8 продукт удовлетворяет требованиям теста на пирогенность, если сумма трех повышений температуры не превышает значение 1,15°, следовательно, образец В оказался сильно пирогенным, что таким образом подтверждается данными теста IPT. Наконец, этот образец имел очень высокий % общего белка, полученного из сред, используемых для культивирования *Streptococcus*, и из таких же бактерий, которые не полностью удалили: согласно монографии о НА Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472, для парентеральных введений, общие белки ограничиваются пределом с максимальным значением не выше 0,1%, следовательно, также и в этом случае образец В характеризуется значением содержания белка, превышающим в приблизительно 100 раз предельное значение. Образец А, очищенный согласно объекту настоящего изобретения, удовлетворяет всем требованиям для инъекционного введения натриевой соли НА: пирогены *in vivo*, обеспечивающие повышение температуры на менее 1,15°C, токсины *in vitro* менее 0,05 EU/мг и общее содержание белка менее 0,1% (Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472).

Этот результат демонстрирует эффективность способа, являющегося объектом настоящего изобре-

тения, поскольку он обеспечивает полную очистку натриевой соли НА даже из особенно загрязненного образца как от эндотоксинов, так и различных видов пирогенов, гарантируя безопасность продукта, который, таким образом, удовлетворяет всем требованиям также в отношении более ограниченных показателей чистоты, как продемонстрировано в данном документе ниже.

Пример 1. Получение и очистка натриевой соли НА из *Streptococcus* с IV в диапазоне 10-15 дл/г.

По завершении процесса ферментации *Streptococcus equi* (68222 мутант Н-1), культивируемого согласно примеру 3 из EP 0716688), 5 л бульона подвергали инактивации путем подкисления до значения pH 4,5 с помощью 1н. HCl. За этим следовала тепловая обработка бульона с повышением температуры до 70°C в течение 20 мин при перемешивании. Бульон затем фильтровали и выливали в воронку Бюхнера, в которой содержалась подготовленная фильтровальная ткань с 200 г целита. По завершении фильтрации продукт нейтрализовали 20% водным раствором NaOH и значение pH регулировали до 7,0. К отфильтрованному бульону добавляли 100 г диатомовой земли и затем CPC в количестве, равном 11 г/л бульона, при перемешивании в течение 30 мин. Всю смесь оставляли отстаиваться в течение 40 мин для обеспечения осаждения новообразованного комплекса CPC-НА. Жидкую фазу удаляли сифонированием. НА, присутствующую в твердой фазе, растворяли с помощью 0,3М водного раствора NaCl при перемешивании в течение 10 ч. Натриевую соль НА наконец отфильтровывали через фильтровальную ткань и фильтровальные картриджи, характеризующиеся тонкостью фильтрации 3 мкм (Pall). 200 г смолы Diaion HP20 добавляли к экстракту, который оставляли перемешиваться в течение 10 ч. Всю смесь фильтровали через пропиленовую ткань и затем последовательно через фильтры (Pall) с тонкостью фильтрации 3 мкм. Водный раствор NaOH добавляли к раствору экстрактов, который нейтрализовали с помощью HCl (с концентрацией 37%), регулируя pH до значения 8,5. Экстракты затем фильтровали через фильтр с тонкостью фильтрации 3 мкм. Раствор натриевой соли НА осаждали этанолом и оставляли перемешиваться в течение 30 мин. Продукту давали осесть в течение 10 мин и супернатант удаляли сифонированием. Продукт промывали этанолом (при перемешивании в течение 10 мин), и затем супернатант удаляли сифонированием (в качестве альтернативы, в случае, если количество бульона превышает 5 л, твердый продукт извлекают путем фильтрации через фильтровальную ткань). Выполняли последнее промывание с помощью ацетона, и твердое вещество извлекали путем фильтрации через фильтровальную ткань. Полученный продукт размещали на подходящих поддонах из нержавеющей стали и высушивали в течение 22 ч при температуре 25°C, под вакуумом. Анализ полученного продукта (согласно Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472): IV: 14,5 дл/г (средневесовая MW: 748000 Да); белки: 0,02%.

Бактериальные эндотоксины (LAL-тест): 0,012 EU/мг.

Выход: для определения общего выхода в способе, являющемся объектом настоящего изобретения, определяли концентрацию НА в карбазоле (Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472), которая присутствовала в бульоне в конце ферментации, и соотносили ее с конечной концентрацией НА, полученной в конце процесса очистки (т.е. рассчитывали отношение между количеством конечного продукта в граммах относительно литров бульона в конце ферментации (затем подвергали очистке), затем рассчитывали простую пропорцию с получением значения выхода, выраженного в виде процентной величины очищенной НА относительно исходной НА, подлежащей очистке).

В этом случае было определено, что концентрация НА в бульоне в конце ферментации составляет 3,3 г/л, а концентрация НА в виде очищенного продукта составляет 3,0 г/л. Следовательно, конечный выход был выше 90%.

Пример 2. Получение и очистка натриевой соли НА из гребней петухов с IV в диапазоне 10-15 дл/г.

250 г сухого порошка, полученного из гребней петухов, как описано в примере 1 из EP 0138572, смешивали с 0,29 г папаина в 10 л буфера из двухосновного фосфата натрия/дигидрата фосфата натрия/EDTA (pH 6,5) при перемешивании в течение 10 мин. Эту смесь затем подвергали тепловой обработке путем повышения ее температуры до 60°C в течение 30 ч. Полученный гомогенат затем фильтровали и откидывали в воронку Бюхнера, в которой содержалась подготовленная полипропиленовая фильтровальная ткань с 200 г целита. К отфильтрованному продукту добавляли 200 г целита при перемешивании, а затем к указанному отфильтрованному продукту добавляли 2 л водного раствора CPC (с концентрацией 29 г/л), оставляя при перемешивании в течение 30 мин. Смесь затем оставляли отстаиваться в течение 40 мин для обеспечения осаждения новообразованного комплекса CPC-НА и жидкую фазу удаляли сифонированием. НА, присутствующую в твердой фазе, растворяли с помощью 4 л 0,3М водного раствора NaCl при перемешивании в течение 10 ч. Наконец натриевую соль НА фильтровали через фильтровальную ткань и фильтровальные картриджи, характеризующиеся тонкостью фильтрации 3 мкм (Pall). В данный момент к экстракту добавляли 200 г смолы Diaion HP20L и смесь оставляли перемешиваться в течение 10 ч. Всю смесь затем фильтровали через полипропиленовую ткань и затем последовательно через фильтры с тонкостью фильтрации 3 мкм (Pall). Натриевую соль НА осаждали с помощью 1,8 объемов этанола при перемешивании в течение 30 мин; продукту давали осесть и супернатант удаляли сифонированием. Осажденный продукт повторно растворяли с помощью 5 л очищенной воды при перемешивании.

0,2М водный раствор NaOH добавляли к полученному раствору, который нейтрализовали с помощью HCl (37%), регулируя pH до значения 8,2. Фильтрацию продолжали с применением фильтров с тон-

костью фильтрации 3 мкм. Полученную натриевую соль НА затем осаждали этанолом при перемешивании в течение 30 мин; продукту давали осесть в течение 10 мин и супернатант удаляли сифонированием. Продукт промывали этанолом, продукту давали осесть в течение 10 мин, и супернатант удаляли сифонированием (в качестве альтернативы в случае, если количество бульона превышает 5 л, твердый продукт извлекают путем фильтрации через фильтровальную ткань). Выполняли последнее промывание с помощью ацетона, и твердое вещество извлекали путем фильтрации через фильтровальную ткань. Полученный продукт размещали на подходящих поддонах из нержавеющей стали и высушивали в течение 22 ч при температуре 40°C, под вакуумом. Анализ полученного продукта (согласно Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472): IV: 14 дл/г (средневесовая MW: 714000 Да); белки: 0,04%.

Бактериальные эндотоксины (LAL-тест): 0,012 EU/мг.

Выход: в этом случае для определения общего выхода в способе концентрацию НА в карбазоле определяли на 1 л продукта ферментативного расщепления, и соотносили ее с конечной концентрацией НА, полученной в конце процесса очистки (т.е. рассчитывали отношение между количеством конечного продукта в граммах относительно литров продукта ферментативного расщепления (затем подвергали очистке), затем рассчитывали простую пропорцию с получением значения выхода, выраженного в виде процентной величины очищенной НА относительно исходной НА, подлежащей очистке). В этом случае конечный выход НА был выше 85%.

Пример 3. Получение и очистка натриевой соли НА из *Streptococcus* с IV в диапазоне 3-6 дл/г.

Процедура была аналогичной описанной в примере 1, но тепловую обработку выполняли при 90°C в течение 250 мин. Конечный продукт высушивали в течение 25 ч при 40°C, под вакуумом.

Анализ полученного продукта (согласно Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472):

IV: 5 дл/г (средневесовая MW: 181000 Да);

белки: 0,015%;

бактериальные эндотоксины (LAL-тест): 0,0075 EU/мг.

Выход: в этом случае было определено, что концентрация НА в бульоне в конце ферментации составляет 3,3 г/л, а в виде очищенного продукта - 2,5 г/л.

Следовательно, конечный выход был выше 75%.

По этой причине дополнительный объект настоящего изобретения относится к способу очистки НА, где максимальные значения общего содержания белков и токсинов, заявленные для натриевой соли НА, в дополнение к общему выходу в конце способа, составляют

0,05% белков по сравнению с 0,1%, установленным в Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472;

002 МЕ/мг эндотоксинов по сравнению с максимальным предельным значением 0,05 МЕ/мг, допускаемым в Евр. Фарм. 5.0, 01/2005: 1472;

Выход: от 75 до 90%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения и очистки натриевой соли гиалуриновой кислоты (НА) из ферментационного бульона *Streptococcus* или *Bacillus*, включающий следующие стадии:

А) инактивация ферментационного бульона, предусматривающая следующие стадии:

A1) подкисление ферментационного бульона до значения pH 4-5;

A2) удаление биомассы *Streptococcus* или *Bacillus* посредством по меньшей мере одной фильтрации;

A3) обеспечение нейтрализации до значения pH 6,5-7,5;

В) экстрагирование, предусматривающее следующие стадии:

V1) добавление целита к среде, содержащей неочищенную НА, и добавление цетилпиридиния хлорида (CPC) в количестве 4-20 г/л с образованием комплекса НА-CPC при перемешивании в течение по меньшей мере 30 мин и последующее осаждение в течение по меньшей мере дополнительных 30 мин;

V2) удаление жидкой фазы, образованной на стадии V1;

V3) растворение НА, присутствующей в твердой фазе, в водном растворе NaCl и сбор первого экстракта в виде натриевой соли НА; причем данную процедуру V3 осуществляют от 1 до 4 раз;

V4) объединение экстрактов, полученных на стадии/стадиях V3;

V5) добавление ароматической смолы, характеризующейся радиусом пор в диапазоне от 200 до 300 Å, к объединенным экстрактам из стадии V4, при этом их оставляют перемешиваться в течение по меньшей мере 8 ч;

V6) фильтрация смеси, полученной на стадии V5;

С) очистка, предусматривающая следующие стадии:

C1) добавление водного раствора NaOH к фильтрату, полученному на стадии V6;

C2) обеспечение нейтрализации до значения pH в диапазоне от 8 до 9;

C3) по меньшей мере одна фильтрация;

C4) осаждение и по меньшей мере одна промывка натриевой соли НА, полученной на стадии C3, этанолом, конечная промывка в органическом растворителе;

С5) высушивание натриевой соли НА.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что ферментационный бульон *Streptococcus* представляет собой ферментационный бульон *Streptococcus equi* подвида *equi* 68222, мутант Н-1.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что фаза инактивации предусматривает тепловую обработку ферментационного бульона путем нагревания для получения НА с высокой, средней или низкой вязкостью.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что тепловую обработку выполняют путем повышения температуры бульона до $60 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 5-40 мин, причем тепловую обработку предпочтительно выполняют при 65°C в течение 5-30 мин.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что тепловую обработку выполняют путем повышения температуры бульона до $70 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 5-40 мин, причем тепловую обработку предпочтительно выполняют при 70°C в течение 5-30 мин.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что тепловую обработку выполняют путем повышения температуры бульона до $90 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 150-300 мин.

7. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что он включает следующие стадии:

А) инактивация ферментационного бульона, предусматривающая следующие стадии:

А1) подкисление бульона до значения рН 4-5, причем предпочтительно применяют 1н. HCl;

А2) возможная тепловая обработка бульона при перемешивании;

А3) удаление биомассы *Streptococcus* или *Bacillus* посредством фильтрации через подушки из целита в количестве от 20 до 60 г/л бульона, предпочтительно 30-40 г/л, возможная фильтрация с применением фильтров, характеризующихся тонкостью фильтрации 0,5 мкм, причем полипропиленовые фильтры являются предпочтительными;

А4) обеспечение нейтрализации до значения рН 6,5-7,5, предпочтительно с помощью 20% водного раствора NaOH;

В) экстрагирование, предусматривающее следующие стадии:

В1) добавление к нейтрализованному фильтрату из стадии А4 целита в количестве от 20 до 60 г/л бульона и добавление СРС в количестве 4-20 г/л, предпочтительно 5-15 г/л, с образованием комплекса НА-СРС, при перемешивании в течение по меньшей мере 30 мин и последующее осаждение в течение по меньшей мере дополнительных 30 мин;

В2) удаление жидкой фазы;

В3) растворение НА, присутствующей в твердой фазе, в 0,3М водном растворе NaCl при перемешивании в течение периода в диапазоне от 4 до 24 ч, фильтрация посредством фильтров, характеризующихся тонкостью фильтрации 3 мкм, и сбор первого экстракта в виде натриевой соли НА; причем данную процедуру В3 осуществляют от 1 до 4 раз;

В4) объединение экстрактов;

В5) добавление ароматической смолы, характеризующейся радиусом пор в диапазоне от 200 до 300 Å, в количестве от 10 до 60 г/л экстракта к объединенным экстрактам из стадии В4, причем смола, состоящая из сшитых полистирольных матриц, является предпочтительной, при этом их оставляют перемешиваться в течение по меньшей мере 8 ч;

В6) стадии фильтрации, предусматривающие применение фильтровальных тканей, также возможно применение фильтров с тонкостью фильтрации 3 мкм, причем полипропиленовые фильтры являются предпочтительными;

С) очистка, предусматривающая следующие стадии:

С1) добавление 0,2-0,4М NaOH в воде при перемешивании к отфильтрованному продукту из стадии В6;

С2) обеспечение нейтрализации до значения рН в диапазоне от 8 до 9, предпочтительно с помощью HCl;

С3) фильтрация, причем тонкость фильтрации, равная 3 мкм, является предпочтительной, причем полипропиленовые фильтры являются более предпочтительными;

С4) осаждение и по меньшей мере одна промывка натриевой соли НА, полученной на стадии С3, этанолом, конечная промывка в органическом растворителе, предпочтительно ацетоне;

С5) высушивание натриевой соли НА предпочтительно при температуре от 25 до 40°C в течение не менее 15 ч, под вакуумом.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что на стадии А1 подкисление проводят с помощью HCl.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что на стадии А3 обеспечение нейтрализации проводят с помощью NaOH.

10. Способ получения и очистки натриевой соли НА из гребней петухов, включающий следующие стадии:

А) тепловая обработка гомогената гребней петухов путем нагревания и одновременное ферментативное расщепление для получения НА с высокой, средней или низкой вязкостью;

В) экстрагирование, предусматривающее следующие стадии:

В1) добавление целита к среде, содержащей неочищенную НА, и добавление цетилпиридиния хлорида (СРС) в количестве 4-20 г/л с образованием комплекса НА-СРС при перемешивании в течение по меньшей мере 30 мин и последующее осаждение в течение по меньшей мере дополнительных 30 мин;

В2) удаление жидкой фазы, образованной на стадии В1;

В3) растворение НА, присутствующей в твердой фазе, в водном растворе NaCl и сбор первого экстракта в виде натриевой соли НА; причем данную процедуру В3 осуществляют от 1 до 4 раз;

В4) объединение экстрактов, полученных на стадии/стадиях В3;

В5) добавление ароматической смолы, характеризующейся радиусом пор в диапазоне от 200 до 300 Å, к объединенным экстрактам из стадии В4, при этом их оставляют перемешиваться в течение по меньшей мере 8 ч;

В6) фильтрация смеси, полученной на стадии В5;

С) очистка, предусматривающая следующие стадии:

С1) добавление водного раствора NaOH к фильтрату, полученному на стадии В6;

С2) обеспечение нейтрализации до значения pH в диапазоне от 8 до 9;

С3) по меньшей мере одна фильтрация;

С4) осаждение и по меньшей мере одна промывка натриевой соли НА, полученной на стадии С3, этанолом, конечная промывка в органическом растворителе;

С5) высушивание натриевой соли НА.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что тепловую обработку осуществляют путем повышения температуры до 50-60°C в течение 26-30 ч, причем тепловую обработку предпочтительно выполняют при 55°C в течение 28 ч.

12. Способ по п.10, отличающийся тем, что тепловую обработку осуществляют путем повышения температуры до 60-65°C в течение 28-30 ч, причем тепловую обработку предпочтительно выполняют при 60°C в течение 30 ч.

13. Способ по п.10, отличающийся тем, что тепловую обработку осуществляют путем повышения температуры до 65-70°C в течение 46-50 ч, причем тепловую обработку предпочтительно выполняют при 65°C в течение 48 ч.

14. Способ по любому из пп.1, 10-13, отличающийся тем, что стадии С очистки предшествуют осаждение натриевой соли НА, полученной на стадии В, в этаноле, удаление растворителя и растворение осадка в очищенной воде.

15. Способ по п.10, отличающийся тем, что стадии В экстрагирования предшествуют тепловая обработка гомогената гребней путем нагревания и одновременное ферментативное расщепление для получения НА с высокой, или средней, или низкой вязкостью, причем он включает следующие стадии:

В) экстрагирование, предусматривающее следующие стадии:

В1) добавление к продукту ферментативного расщепления целита в количестве от 20 до 60 г/л гомогената, подвергнутого ферментативному расщеплению, и добавление СРС в количестве от 4 до 20 г/л, предпочтительно 5-15 г/л, с образованием комплекса НА-СРС при перемешивании в течение по меньшей мере 30 мин и последующее осаждение в течение по меньшей мере дополнительных 30 мин;

В2) удаление жидкой фазы;

В3) растворение НА, присутствующей в твердой фазе, в 0,3М водном растворе NaCl при перемешивании в течение периода в диапазоне 4-24 ч, фильтрация посредством фильтров, характеризующихся тонкостью фильтрации 3 мкм, и сбор первого экстракта в виде натриевой соли НА; причем данную процедуру В3 осуществляют от 1 до 4 раз;

В4) объединение экстрактов, полученных на стадии/стадиях В3;

В5) добавление ароматической смолы, характеризующейся радиусом пор в диапазоне от 200 до 300 Å, в количестве от 10 до 60 г/л экстракта к объединенным экстрактам из стадии В4, предпочтительно смолы, состоящей из сшитых полистирольных матриц, при этом их оставляют перемешиваться в течение по меньшей мере 8 ч;

В6) стадии фильтрации, предусматривающие применение фильтровальных тканей, также возможно применение фильтров с тонкостью фильтрации 3 мкм, причем полипропиленовые фильтры являются предпочтительными;

С) очистка, предусматривающая следующие стадии:

С1) добавление 0,2-0,4М NaOH в воде при перемешивании к отфильтрованному продукту из стадии В6;

С2) обеспечение нейтрализации до значения pH в диапазоне от 8 до 9, предпочтительно с помощью HCl;

С3) фильтрация, причем тонкость фильтрации, равная 3 мкм, является предпочтительной, предпочтительно с применением полипропиленовых фильтров;

С4) осаждение и по меньшей мере одна промывка натриевой соли НА, полученной на стадии С3, этанолом, конечная промывка в органическом растворителе, предпочтительно ацетоне;

С5) высушивание натриевой соли НА, предпочтительно при температуре от 25 до 40°C в течение не менее 15 ч, под вакуумом.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что стадии С очистки предшествуют осаждение натриевой соли НА, полученной на стадии В экстрагирования, в этаноле, удаление растворителя и растворение осадка в очищенной воде.

17. Способ по п.1 или 10, отличающийся тем, что на стадии В5 смола состоит из сшитых полистирольных матриц.

18. Способ по п.1 или 10, отличающийся тем, что на стадии С2 обеспечение нейтрализации проводят с помощью HCl.

19. Способ по п.1 или 10, отличающийся тем, что на стадии С4 органический растворитель представляет собой ацетон.

20. Способ по п.1 или 10, отличающийся тем, что на стадии С5 высушивание натриевой соли НА проводят при температуре от 25 до 40°C в течение не менее 15ч, под вакуумом.

