

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293173** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.03.03

(51) Int. Cl. *C12P 19/26* (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.08

(54) **СПОСОБ ЭКСТРАКЦИИ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГРИБА, ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **102020000013618; 102020000013633**

(32) **2020.06.08**

(33) **IT**

(86) **PCT/IB2021/055031**

(87) **WO 2021/250566 2021.12.16**

(71) Заявитель:
ВИВАТИС ФАРМА ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

Черана Джорджио Стефано, Бос Петер (DE)

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Способ экстракции из растительного исходного материала, такого как гриб, для получения гиалуроновой кислоты или ее соли (НА), имеющих среднemasсовую молекулярную массу от 10 до 600 кДа.

A1

202293173

202293173

A1

Способ экстракции гиалуроновой кислоты из гриба, гиалуроновая кислота растительного происхождения и ее применение

Настоящее изобретение относится к смеси, содержащей или, альтернативно, состоящей из по меньшей мере одного гликозаминогликана, полученного из исходного растительного материала и выбранного из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из гиалуроновой кислоты или ее соли (соли аниона гиалуроната) (сокращенно, вместе или по отдельности, HA), и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат или его соль (сокращенно, вместе или по отдельности, CS), растительного происхождения, имеющего высокую степень чистоты и пониженное содержание загрязняющих веществ и/или побочных продуктов.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению вышеуказанной смеси в качестве добавки, эксципиента или ингредиента при приготовлении фармацевтических продуктов, медицинских устройств, нутрицевтических продуктов, пищевых продуктов для специальных медицинских целей (FSMP), пищевых продуктов или пищевых добавок.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей (i) указанную смесь, содержащую или, альтернативно, состоящую из гиалуроновой кислоты или ее соли (соли аниона гиалуроната) (сокращенно, вместе или по отдельности, HA) и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат или его соль (сокращенно CS), растительного происхождения, и (ii) возможно технологические добавки и эксципиенты фармацевтического или пищевого качества.

Кроме того, настоящее изобретение относится к указанной композиции, содержащей указанную смесь для применения в качестве лекарственного средства.

Кроме того, настоящее изобретение относится к указанной композиции, содержащей указанную смесь, для применения в способе профилактического или радикального лечения людей и животных, страдающих определенными нарушениями, или патологиями или заболеваниями, выбранными из артрита, остеоартрита, артроза, болей в суставах, воспалений конечностей и суставов, гастроэзофагеального рефлюкса.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения указанной смеси и указанной композиции, включающей указанную смесь, содержащую или, альтернативно, состоящую из гиалуроновой кислоты или ее соли (соли аниона гиалуроната) (сокращенно, вместе или по отдельности, HA) и/или хондроитина или его

соли, такой как хондроитинсульфат или его соль (сокращенно CS), растительного происхождения.

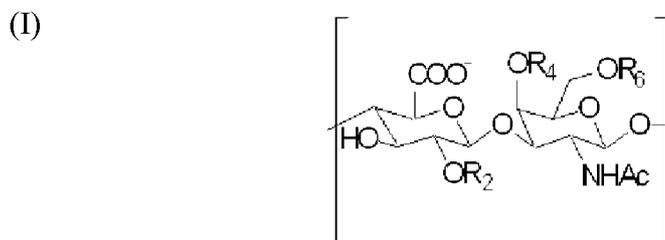
Наконец, настоящее изобретение относится к применению гриба в качестве исходного растительного материала для получения гиалуроновой кислоты или ее соли и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат или его соль, растительного происхождения с высокой степенью чистоты и пониженным содержанием загрязняющих веществ и/или побочных продуктов.

Гиалуроновая кислота представляет собой анионный несulfатный гликозаминогликан (GAG), который широко распространен в соединительной, эпителиальной и нервной тканях позвоночных. Гиалуроновая кислота выполняет важные структурные, реологические и физиологические функции.

Петушиные гребни и пуповины человека имеют очень высокие концентрации гиалуроновой кислоты, соответственно 7500 мг/л и 4100 мг/л. По этой причине в начале 80-х годов Эндре А. Балаш и его сотрудники разработали процедуру выделения и очистки гиалуроновой кислоты из петушиных гребней и пуповины человека. С тех пор гиалуроновую кислоту производят из петушиных гребней в промышленных масштабах.

Хондроитинсульфат представляет собой сульфат GAG, который состоит из цепи чередующихся звеньев сахара, N-ацетилгалактозамина и глюкуроновой кислоты. Цепь хондроитинсульфата может состоять из сотен звеньев сахара, каждое из которых может быть сульфатировано в различных положениях и количестве. Благодаря высокой прочности на сжатие хондроитинсульфат является важным структурным компонентом хряща.

Хондроитинсульфат имеет повторяющееся звено (дисахарид) следующей общей формулы (I):



где по меньшей мере один из R_2 , R_4 и R_6 представляет собой сульфитную группу (SO_3^-). В хондроитинмоносульфате только одна из групп R_2 , R_4 и R_6 является сульфитной группой. Таким образом, три возможных моносульфатированных хондроитина представляют собой 6-хондроитинсульфат ($R_2=H$; $R_4=H$; $R_6=SO_3^-$), 4-хондроитинсульфат ($R_2=H$; $R_4=SO_3^-$; $R_6=H$) и 2-хондроитинсульфат ($R_2=SO_3^-$; $R_4=H$; $R_6=H$).

Большую часть хондроитинсульфата получают из экстрактов хрящей животных, в основном из тканей крупного рогатого скота и свиней (например из трахеи, уха и носа), но также могут использоваться и другие источники, такие как хрящи акул, рыб и птиц.

Несмотря на многочисленные и бесспорные с точки зрения эффективности медицинские применения гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата у млекопитающих, в частности у людей, способы получения путем экстракции из животных предшественников сегодня сталкиваются с растущей озабоченностью и опасениями, в том числе этического, религиозного и нравственного характера. Основная озабоченность и опасения возникают в связи с использованием продуктов, полученных из животных, или животного происхождения для получения гиалуроновой кислоты или ее соли и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат, особенно когда эти соединения или соли предназначены для пищевых, биомедицинских или фармацевтических целей. Кроме того, хондроитинсульфат и гиалуроновая кислота, экстрагированные из животных источников, имеют высокие молекулярные массы, в то время как было бы выгодно иметь хондроитинсульфат и/или гиалуроновую кислоту с низкой молекулярной массой, поскольку они обладают лучшими свойствами чрескожного проникновения.

В предшествующем уровне техники известны хондроитинсульфаты неживотного происхождения, полученные путем введения сульфатной группы в несульфатированный хондроитин, полученный с помощью процессов бактериальной ферментации.

Таким образом, в области фармацевтических продуктов, медицинских устройств, нутрицевтических продуктов, пищевых продуктов для специальных медицинских целей (FSMP), пищевых добавок или пищевых продуктов у операторов рынка существует острая потребность и спрос на гиалуроновую кислоту или ее соль и/или хондроитин или его соль, такую как хондроитинсульфат, полученные альтернативным способом по сравнению с существующими и которые могут использоваться всеми категориями потребителей, включая веганов, вегетарианцев, людей, страдающих аллергией, и любыми лицами которым по религиозным или идеологическим причинам в настоящее время закрыт доступ к продуктам или лекарственным средствам, содержащим гиалуроновую кислоту или ее соль и/или хондроитин или его соль. Кроме того, существует потребность в получении хондроитинсульфата и/или гиалуроновой кислоты неживотного происхождения способами, которые являются экономически выгодными по сравнению с тем, что известно в данной области техники, и простыми в применении.

После длительных и интенсивных исследований и разработок заявитель разработал технологию и способ получения, способные обеспечить адекватный ответ на существующие ограничения, недостатки и проблемы.

Таким образом, объектом настоящего изобретения является смесь, содержащая или, альтернативно, состоящая из по меньшей мере одного гликозаминогликана, полученного из исходного растительного материала, выбранного из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из гиалуроновой кислоты или ее соли (соль аниона гиалуроната) (сокращенно, вместе или по отдельности, НА), и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат или его соль (сокращенно, вместе или по отдельности, CS), и их сочетаний, растительного происхождения, имеющая характеристики, указанные в приложенной формуле изобретения.

Кроме того, объектом настоящего изобретения является применение вышеуказанной смеси в качестве добавки, эксципиента или ингредиента при приготовлении фармацевтических продуктов, медицинских устройств, нутрицевтических продуктов, пищевых продуктов для специальных медицинских целей (FSMP), продуктов питания или пищевых добавок, указанное применение имеет характеристики, определенные в прилагаемой формуле изобретения.

Другим объектом настоящего изобретения является композиция, содержащая (i) указанную смесь, содержащую или альтернативно состоящую из гиалуроновой кислоты или ее соли (соли аниона гиалуроната) (сокращенно, вместе или по отдельности, НА) и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат (сокращенно CS) растительного происхождения, и (ii) возможно технологические добавки и эксципиенты фармацевтического или пищевого качества, имеющая характеристики, определенные в прилагаемой формуле изобретения.

Другим объектом настоящего изобретения является смесь и по меньшей мере одна технологическая добавка или эксципиент или композиция для применения в качестве лекарственного средства (первое медицинское применение), обладающая характеристиками, определенными в прилагаемой формуле изобретения.

Другим объектом настоящего изобретения является смесь или композиция, содержащая указанную смесь для применения в способе профилактического или радикального лечения людей и животных, имеющих определенные нарушения или патологии, или заболевания, выбранные из артрита, остеоартрита, артроза, боли в суставах, воспаления конечностей и суставов, гастроэзофагеального рефлюкса (второе медицинское применение), указанное применение имеет характеристики, определенные в прилагаемой формуле изобретения.

Кроме того, еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения указанной смеси или указанной композиции, содержащей указанную смесь, содержащую или, альтернативно, состоящую из гиалуроновой кислоты или ее соли (соли

аниона гиалуроната) (сокращенно, вместе или по отдельности, НА) и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат (сокращенно CS) растительного происхождения, имеющий характеристики, определенные в прилагаемой формуле изобретения.

Наконец, объектом настоящего изобретения является применение гриба в качестве исходного растительного материала для получения гиалуроновой кислоты или ее соли и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат или его соль, с высокой степенью чистоты и пониженным содержанием примесей и/или побочных продуктов, имеющее характеристики, определенными в прилагаемой формуле изобретения.

Далее описаны предпочтительные воплощения настоящего изобретения со ссылкой на приложенные чертежи, где:

- на фиг.1-4 показаны блок-схемы способа, являющегося предметом настоящего изобретения, согласно различным воплощениям (первое воплощение, P1);

- на фиг.5 и 6 показаны блок-схемы способа, являющегося предметом настоящего изобретения, по второму воплощению (P2);

- на фиг.7 и 8 показаны блок-схемы способа, являющегося предметом настоящего изобретения, по третьему воплощению (P3);

- на фиг. 9 и 10 показаны два спектра ВЭЖХ для определения ненасыщенных дисахаридов в образце, содержащем НА, и в образце, содержащем CS, соответственно.

Следует отметить, что в контексте настоящего описания выражение «НА» используется для обозначения гиалуроновой кислоты или ее соли, или гиалуроната, или их комбинации. Выражение «CS», с другой стороны, используется для обозначения хондроитина, соли хондроитина, предпочтительно хондроитинсульфата или его соли, или их смесей.

Следует отметить, что в данном описании термины «исходный растительный материал» и «исходный материал растительного происхождения» являются синонимами и поэтому используются взаимозаменяемо.

Подробное описание изобретения

Объектом настоящего изобретения является смесь (m), включающая или, альтернативно, состоящая из по меньшей мере одного гликозаминогликана, полученного из исходного материала растительного происхождения. Указанный материал растительного происхождения выбран из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из одного или более натуральных грибов.

Указанный гликозаминогликан выбран из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из:

- (a) гиалуроновой кислоты или ее соли, аниона гиалуроната (сокращенно HA);
- (b) хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат (сокращенно CS) или его соль;
- (c) сочетания (a) и (b).

Исходным растительным материалом является гриб. Гриб представляет собой гриб, который произрастает и встречается в природе, например, его можно найти и собрать в лесу, но его также можно выращивать в теплице.

Гриб относится к подцарству Дикария, предпочтительно к отделу *Basidiomycota*.

Дикария представляет собой подцарство грибов, включающее отделы *Ascomycota* и *Basidiomycota*. Базидиомицеты (*Basidiomycota* R.T. Moore, 1980) представляют собой один из крупнейших типов, образующих царство грибов.

В соответствии с воплощением, исходный растительный материал представляет собой гриб вида *Tremella fuciformis*, или указанный исходный растительный материал содержит или, альтернативно, состоит из гриба вида *Tremella fuciformis*.

Tremella fuciformis (Berk. 1856) (также известный как снежный гриб или дрожалка фукусовидная) представляет собой гриб, происходящий из тропических и субтропических районов, где он произрастает в изобилии на мертвых бревнах лиственных пород, и его также культивируют, чтобы удовлетворить чрезвычайно высокий спрос, особенно в Японии и Китае, в кулинарии и народной медицине. *Tremella fuciformis* образует белые студенистые плодоносящие тела (базидиокарпы), похожие на лист папоротника.

Использование *Tremella fuciformis* в настоящем изобретении дает особенное преимущество с учетом того, что, начиная с исходного растительного материала, разработанная в данном изобретении технология экстракции (первое воплощение (P1), второе воплощение (P2) и третье воплощение (P3)), позволяет производить как HA, так и CS полностью растительного происхождения (и с низкой молекулярной массой). Гликозаминогликаны HA и/или CS, содержащиеся в смеси (m) и полученные способом по настоящему изобретению, обладают отличительными характеристиками, которые делают их особенно эффективными, прежде всего благодаря их пониженной молекулярной массе, по отношению к HA и/или CS, получаемых из хрящей животных в соответствии с предшествующим уровнем техники. Низкая молекулярная масса позволяет обеспечить гликозаминогликаны HA и/или CS с улучшенными свойствами чрескожного проникновения.

Более конкретно, гиалуроновая кислота или ее соль (гиалуронат), полученная способом по настоящему изобретению (P1 и/или P2), имеет среднемассовую молекулярную массу от 10 кДа до 600 кДа, предпочтительно от 100 кДа до 500 кДа, еще более предпочтительно от 200 кДа до 400 кДа или от 100 кДа до 300 кДа, например, среднемассовую молекулярную массу примерно 50 кДа, 150 кДа или 250 кДа, или 300 кДа, или 350 кДа, или 450 кДа, или 550 кДа. Предпочтительно указанная НА имеет массовое процентное содержание хондроитина (предпочтительно несulfатированного хондроитина), составляющее от 0,01% до 5%, предпочтительно составляющее от 0,1% до 3%, еще более предпочтительно составляющее от 0,5% до 2%, например 1% или 2% по отношению к общей массе указанной НА, экстрагированной из гриба.

В соответствии с предпочтительным аспектом настоящего изобретения, НА, имеющая среднемассовую молекулярную массу, попадающую в такие диапазоны, обладает высокой способностью чрескожного проникновения из-за ограниченного размера молекулы.

Хондроитин или его соль, такая как хондроитинсульфат или его соль (CS), полученная способом по настоящему изобретению (P1 и/или P3), имеет среднемассовую молекулярную массу, составляющую от 1 кДа до 50 кДа или от более 5 кДа до менее 50 кДа, предпочтительно от 3 кДа до 40 кДа, еще более предпочтительно от 5 кДа или от более 5 кДа до 25 кДа или от более 5 кДа до 10 кДа, например, среднемассовую молекулярную массу примерно 4 кДа, или 6 кДа, или 8 кДа, или 10 кДа, или 12 кДа, или 14 кДа, или 16 кДа, или 18 кДа, или 22 кДа, или 24 кДа.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту настоящего изобретения, CS со среднемассовой молекулярной массой, находящейся в указанных в этом документе диапазонах, также оказался эффективным при снижении повреждения костей от остеоартрита коленного и тазобедренного суставов.

CS, содержащийся в смеси (m) по настоящему изобретению, включает хондроитинсульфат, имеющий среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа ($1000,00 \text{ Да} = 1 \times 10^3 \text{ Да}$) до 50 кДа, предпочтительно от 3 кДа до 40 кДа, еще более предпочтительно от 5 кДа до 25 кДа, например, среднемассовую молекулярную массу примерно 4 кДа, или 6 кДа, или 8 кДа, или 10 кДа, или 12 кДа, или 14 кДа, или 16 кДа, или 18 кДа, или 22 кДа, или 24 кДа.

Предпочтительно указанный CS имеет плотность заряда от 0,70 до 0,99 или от 0,70 до 1,50, предпочтительно от 0,75 до 0,98 или от 0,75 до 1,20, еще более предпочтительно от 0,80 до 0,97, например 0,85; 0,87; 0,90; 0,92; 0,94 или 0,96.

Более предпочтительно указанный CS (полученный в способе P1 и/или P3) имеет массовое процентное содержание 6-хондроитинсульфата от 50 до 99,5%, предпочтительно от 50 до 95%, более предпочтительно от 75% до 88%, еще более предпочтительно от 78% до 86%, например, примерно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% по отношению к общей массе указанного CS (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Помимо 6-хондроитинсульфата указанный CS предпочтительно содержит несulfатный хондроитин (несulfатированный хондроитин).

Массовое процентное содержание несulfатированного хондроитина предпочтительно составляет от 0,1% до 25%, предпочтительно от 0,5% до 20% или от 5% до 20%, более предпочтительно от 7% до 15%, еще более предпочтительно от 8% до 13%, например, примерно 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5,5%, 6%, 8%, 9%, 10%, 11% или 12% по отношению к общей массе указанного CS (или по отношению к общей массе дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Помимо 6-хондроитинсульфата и несulfатированного хондроитина указанный CS предпочтительно содержит 2,6-хондроитиндисульфат.

Предпочтительно 2,6-хондроитиндисульфат имеет массовое процентное содержание от 0,1% до 10%, предпочтительно от 0,2% до 8%, еще более предпочтительно от 0,3% до 5%, например, примерно 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 4,5% по отношению к общей массе указанного CS (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Помимо 6-хондроитинсульфата, несulfатированного хондроитина и 2,6-хондроитиндисульфата, указанный CS предпочтительно содержит 4-хондроитинсульфат (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Предпочтительно 4-хондроитинсульфат имеет массовое процентное содержание от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, еще более предпочтительно от 0,1% до 1,5%, например, примерно 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1% по отношению к общей массе указанного CS (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Помимо 6-хондроитинсульфата, несультатированного хондроитина, 2,6-хондроитиндисульфата и 4-хондроитинсульфата указанный CS предпочтительно содержит 4,6-хондроитиндисульфат.

Предпочтительно 4,6-хондроитиндисульфат имеет массовое процентное содержание от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, еще более предпочтительно от 0,1% до 1,5%, например, примерно 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1% по отношению к общей массе указанного CS (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Помимо 6-хондроитинсульфата, несультатированного хондроитина и 2,6-хондроитиндисульфата, 4-хондроитинсульфата и 4,6-хондроитиндисульфата указанный CS предпочтительно содержит 2,4-хондроитиндисульфат (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Предпочтительно 2,4-хондроитиндисульфат имеет массовое процентное содержание от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, еще более предпочтительно от 0,1% до 1,5%, например примерно 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1,0% по отношению к общей массе указанного CS (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате; % определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Помимо 6-хондроитинсульфата, несультатированного хондроитина, 2,6-хондроитиндисульфата, 4-хондроитинсульфата, 4,6-хондроитиндисульфата и 2,4-хондроитиндисульфата указанный CS предпочтительно содержит гиалуроновую кислоту или гиалуронат (предпочтительно несультатированный). Предпочтительно указанная НА присутствует при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, еще более предпочтительно от 0,1% до 1,5%, например, 0,8% или 1,0% по отношению к общей массе указанного CS.

Согласно одному воплощению CS, содержащийся в смеси (m) и полученный способом по настоящему изобретению (P1 и/или P3), содержит:

- 6-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 50% до 99,5%, предпочтительно от 50% до 95±0,5%, более предпочтительно от 75% до 88%, еще более предпочтительно от 78% до 86%;

- несультфатированный хондроитин при массовом процентном содержании от 0,1% до 25%, предпочтительно от 0,5% до 20%, более предпочтительно от 7% до 15%, еще более предпочтительно от 8% до 13%;

- 2,6-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,1% до 10%, предпочтительно от 0,2% до 8%, еще более предпочтительно от 0,3% до 5%, и кроме того,

- 4-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, еще более предпочтительно от 0,1% до 1,5%,

- 4,6-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, еще более предпочтительно от 0,1% до 1,5%, и

- 2,4-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, еще более предпочтительно от 0,1% до 1,5%.

Например, CS, содержащийся в смеси (m) и полученный способом по настоящему изобретению, имеет состав CS.1, CS.2, CS.3, CS.4, CS.5 или состав CS.6, в соответствии с приведенной ниже таблицей 1 (значения выражены в массовых процентах каждого компонента по отношению к общей массе указанного CS.n при n=1-6).

Таблица 1

CS, содержащийся в смеси (m)	CS.1	CS.2	CS.3	CS.4	CS.5	CS.6
Несультфатированный хондроитин	10,6	11,5	10,8	8,9	2,9	1,7
6-хондроитинсульфат	85,3	79,7	84,7	87,9	92,6	95,7
4- хондроитинсульфат	0,0	0,2	0,4	0,6	0,1	0,4
2,6-хондроитиндисульфат	4,1	0,5	2,4	1,9	3,4	0,5
4,6- хондроитинсульфат	0,0	0,9	0,8	0,3	0,4	0,9
2,4- хондроитинсульфат	0,0	1,0	0,9	0,4	0,6	0,8
Плотность заряда	0,94	0,85	0,95	0,92	0,94	0,96

Объектом настоящего изобретения является композиция, включающая: (i) вышеуказанную смесь (m), содержащую или, альтернативно, состоящую из (a) НА со среднемассовой молекулярной массой от 10 кДа до 600 кДа (предпочтительно от 100 кДа до 500 кДа, еще более предпочтительно от 200 до 400 кДа или от 100 кДа до 300 кДа, например, примерно 150 кДа, или 250 кДа, или 300 кДа, или 350 кДа, или 450 кДа, или 550 кДа), и /или (b) CS со среднемассовой молекулярной массой от 1 кДа до 50 кДа или от более 5 кДа до менее 50 кДа (предпочтительно от 3 кДа до 40 кДа, еще более предпочтительно от 5 или более 5 кДа до 25 кДа, например, примерно 4 кДа, или 6 кДа, или 8 кДа, или 10 кДа, или 12 кДа, или 14 кДа, или 16 кДа, или 18 кДа, или 22 кДа, или

24 кДа), и (ii) возможно технологические добавки и вспомогательные вещества фармацевтического или пищевого качества.

Такая композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, композицию медицинского устройства (EU) 2017/745, композицию с нутрицевтической функцией, композицию пищевых продуктов для специальных медицинских целей (FSMP), композицию пищевой добавки или композицию пищевого продукта, или новую пищевую композицию (EU) 2015/2283.

Такую композицию можно использовать в качестве лекарственного средства или в качестве композиции для применения при профилактическом и/или радикальном лечении артрита, остеоартрита, артроза, болей в суставах, воспалений конечностей и суставов, гастроэзофагеального рефлюкса.

Объектом настоящего изобретения являются технология и способ получения гиалуроновой кислоты или гиалуроната (HA) (способ P1 и/или P2) и/или хондроитинсульфата, или хондроитина, или их соли (CS) (способ P1 и/или P3), указанный способ включает по меньшей мере одну стадию экстракции гиалуроновой кислоты или гиалуроната и/или хондроитинсульфата или хондроитина из исходного материала растительного происхождения, например, исходного материала растительного происхождения, содержащего или, альтернативно, состоящего из по меньшей мере одного натурального гриба, принадлежащего к подцарству Дикария, предпочтительно отделу *Basidiomycota*, более предпочтительно виду *Tremella fuciformis*.

Способы по настоящему изобретению (первое воплощение (P1), второе воплощение (P2) и третье воплощение (P3)) не включают стадии ферментации и/или расщепления бактериями, как, например, бактериальные ферментации, описанные в патентных документах WO 2012/152872 A1 и EP 2852437 B1 для получения хондроитина или хондроитинсульфата.

Различные воплощения этого способа показаны на блок-схемах фиг. 1-8.

Согласно первому воплощению (P1) способ по настоящему изобретению включает следующие стадии:

(i) идентификация одного или более натуральных грибов в качестве растительного исходного материала для гликозаминогликана; например, одного или более натуральных грибов в сухом или высушенном виде, предпочтительно включающих или, альтернативно, состоящих из по меньшей мере одного гриба, принадлежащего к подцарству Дикария, предпочтительно к отделу *Basidiomycota*, более предпочтительно к виду *Tremella fuciformis*;

(ii) возможно проведение дробления или измельчения исходного растительного материала;

(iii) экстракция указанного гликозаминогликана (HA или CS) из исходного растительного материала, полученного на стадии (i) или на стадии (ii), с использованием растворителя для экстракции, предпочтительно водного растворителя, еще более предпочтительно воды (например, дистиллированной или дважды дистиллированной вода) с получением водного экстракта указанного гликозаминогликана;

(iv) добавление растворителя, предпочтительно этанола, к водному экстракту, полученному на стадии (iii), с получением жидкого продукта;

(v) проведение центрифугирования и/или фильтрации жидкого продукта, полученного на стадии (iv), с получением жидкой фазы и твердого остатка;

(vi) проведение обработки жидкой фазы, полученной в результате центрифугирования и/или фильтрации на стадии (v), посредством следующей стадии (vi.a) и/или обработки твердого остатка, полученного в результате центрифугирования и/или фильтрации на стадии (v) посредством следующих стадий (vi.b), (vi.c), (vi.d) и (vi.e):

(vi.a) сушка, предпочтительно концентрирование и сушка жидкой фазы, полученной на стадии (v), с получением гиалуроновой кислоты или ее соли со среднемассовой молекулярной массой от 10 кДа до 600 кДа;

и/или

(vi.b) извлечение и очистка твердого остатка, полученного на стадии (v), с получением хондроитина или его соли (CS), имеющего среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа;

(vi.c) обработка хондроитина или его соли (CS), полученного на стадии (vi.b), источником серной кислоты, выбираемым из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из серной кислоты, пиридинового комплекса триоксида серы, диметилформамидного комплекса триоксида серы и их смеси, с получением подкисленного продукта;

(vi.d) нейтрализация подкисленного продукта, полученного на стадии (vi.c), с использованием основного агента с получением нейтрализованного продукта;

(vi.e) концентрирование и сушка нейтрализованного продукта, полученного на стадии (vi.d), с получением хондроитинсульфата или его соли со среднемассовой молекулярной массой от 1 кДа до 50 кДа.

Исходный растительный материал, подвергаемый экстракции на стадии (iii), может быть в неизменном виде (т.е. цельным куском, например, целый гриб), или он может быть

дробленным (на кусочки или хлопья) или измельченным (с получение гранул, порошка или зерен) на стадии (ii) растительным материалом.

Блок-схемы на фиг. 1 и фиг. 2 показывают воплощения способа по настоящему изобретению в соответствии с первым воплощением (P1), в котором натуральный гриб или множество грибов, идентифицированных на стадии (i), экстрагируют на стадии (iii) или стадиях (iii.a) и (iii.b) с получением водного экстракта.

Блок-схемы на фиг. 3 и фиг. 4 показывают воплощения способа, являющегося предметом настоящего изобретения, в соответствии с первым воплощением (P1) (способ, осуществляемый в соответствии с методиками и устройствами, известными специалисту в данной области), в которых натуральный гриб или множество грибов, идентифицированных на стадии (i), дробят или измельчают на стадии (ii). Затем натуральный гриб или множество грибов, дробленых или измельченных на стадии (ii), экстрагируют на стадии (iii) или стадиях (iii.a) и (iii.b) с получением водного экстракта.

В случае, когда исходный растительный материал дробят или измельчают (в соответствии с методикой и устройством, известными специалисту в данной области) на стадии (ii), распределение среднего размера частиц указанного исходного растительного материала предпочтительно составляет от 500 мкм и 2500 мкм, более предпочтительно от 800 мкм до 1800 мкм, еще более предпочтительно от 900 мкм до 1200 мкм.

В соответствии с одним воплощением исходный растительный материал, поставляемый на стадию (iii) (со стадии (i) или (ii)) представляет собой растительный материал, дробленный на кусочки или хлопья или измельченный до гранул или зерен.

Исходный растительный материал, поставляемый на стадию (iii) (со стадии (i) или (ii)) предпочтительно является сухим или высушенным, т.е. он представляет собой исходный растительный материал, содержащий массовое количество воды, составляющее от примерно 2% до 20%, предпочтительно от 5% до 15%, еще более предпочтительно от 8% до 10% по отношению к общей массе исходного растительного материала.

На стадии (iii) растворитель для экстракции выбирают из водного растворителя и воды.

Водный растворитель (или водный раствор) предпочтительно представляет собой водно-спиртовую смесь, в которой спирт (например, этанол) присутствует в массовом процентном содержании от 0,1% до 50%, более предпочтительно от 0,5% до 25%, еще более предпочтительно от 1% до 15% по отношению к общей массе растворителя для экстракции, например, в массовом процентном содержании примерно 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5% , 7,5%, 10%, 20%.

Вода предпочтительно представляет собой дистиллированную или дважды дистиллированную воду.

На стадии (iii) исходный растительный материал непрерывно или партиями загружают в контейнер или устройство для экстракции, например, снабженное средствами механического перемешивания, нагревательными средствами, фильтрующими средствами, а также средствами регулирования температуры и давления.

На стадии (iii) исходный растительный материал затем экстрагируют в указанном контейнере или устройстве для экстракции с помощью растворителя для экстракции, так что гиалуроновая кислота или ее соль переходят в раствор в жидкой фазе в водный экстракт, а хондроитин остается в твердом остатке.

Экстракцию на стадии (iii) проводят с использованием отношения [масса исходного растительного материала]:[объем растворителя для экстракции] от 1:1 до 1:90, предпочтительно от 1:10 до 1:90, более предпочтительно от 1:20 до 1:75, еще более предпочтительно от 1:40 до 1:60, например, 1:3, 1:5, 1:15, 1:25, 1:45, 1:50 или 1:55. Экстракцию на стадии (iii) проводят в течение периода времени от 1 минуты до 12 часов, предпочтительно от 10 минут до 9 часов, еще более предпочтительно от 15 минут до 4 часов, например, примерно за 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 150 минут или 180 минут.

Стадию (iii) предпочтительно проводят при атмосферном давлении ($P = 0,1$ МПа (1 атм.) при 20-25°C) и температуре растворителя для экстракции от 10°C до 90°C, предпочтительно от 20°C до 60°C, еще более предпочтительно от 35°C до 55°C, например, примерно 25°C, 30°C, 40°C, 44°C, 48°C или 50°C.

Предпочтительно значение pH растворителя для экстракции на стадии (iii) составляет от 3 до 10, предпочтительно от 3,5 до 9, более предпочтительно от 4 до 8, еще более предпочтительно от 5 до 7, например, значение pH составляет примерно 4,5; 5,5; 6; 6,5; 7,5; 8,5; или 9,5.

При экстракции на стадии (iii) предпочтительно используют протеолитический фермент для разложения поверхностных пектинов материала растительного происхождения и, таким образом, увеличения выхода способа. Предпочтительно протеолитический фермент включает или, альтернативно, состоит из бромелайна или экстракта бромелайна.

Бромелайн представляет собой ферментный экстракт плодов и/или стеблей ананаса, содержащий протеолитические ферменты и другие вещества в меньших количествах.

Чтобы увеличить выход экстракции, стадию (iii) предпочтительно проводят в две стадии, как описано ниже:

(iii.a) первая экстракция из исходного растительного материала первым объемом растворителя для экстракции при температуре от 10°C до 90°C, предпочтительно от 20°C до 60°C, еще более предпочтительно от 35°C до 55°C в течение периода времени от 1 минуты или 30 минут до 12 часов, предпочтительно от 10 минут до 9 часов, еще более предпочтительно от 15 минут до 4 часов, с получением первого водного экстракта; и

(iii.b) вторая экстракция из исходного растительного материала (или из твердого остатка указанной первой стадии экстракции (iii.a)) вторым объемом растворителя для экстракции при температуре от 80°C до 120°C, предпочтительно от 90°C до 110°C, предпочтительно от 95°C до 105°C, еще более предпочтительно от 98°C до 102°C, предпочтительно под давлением или при пониженном давлении, в течение периода времени, составляющего от 10 минут до 6 часов или от 30 минут до 8 часов, предпочтительно от 20 минут до 4 часов, еще более предпочтительно от 40 минут до 2 часов, например, в течение периода времени примерно 30 минут, 60 минут или 90 минут, с получением второго водного экстракта. Предпочтительно при первой экстракции (iii.a) используют первый объем растворителя для экстракции, в 25-75 раз превышающий массу исходного растительного материала, предпочтительно в 35-65 раз, еще более предпочтительно в 45-55 раз, например, примерно в 30 раз или в 50 раз.

Предпочтительно при второй экстракции (iii.b) используют второй объем растворителя для экстракции, в 10-150 раз, предпочтительно в 75-125 раз превышающий массу исходного растительного материала, более предпочтительно в 85-115 раз превышающий массу исходного растительного материала, еще более предпочтительно от 95 до 105 раз, например примерно в 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз.

В соответствии с указанным первым воплощением (P1) способа получения НА и/или CS первый водный экстракт, полученный на стадии (iii.a), и второй водный экстракт, полученный на стадии (iii.b), затем объединяют и к ним добавляют растворитель согласно стадии (iv).

На стадии (iv) растворитель, предпочтительно этанол, добавляют к водному экстракту, полученному на стадии (iii), или к первому водному экстракту, полученному на стадии (iii.a), и ко второму водному экстракту, полученному на стадии (iii.b) с получением жидкого продукта.

На стадии (v) жидкий продукт, полученный на стадии (iv), и исходный растительный материал, присутствующий (например, в виде надосадочной жидкости или

осадка) в таком продукте, центрифугируют и/или пропускают через фильтрующее средство (первая фильтрация), которое задерживает твердую часть (твердый остаток) и пропускает жидкую фазу.

На стадии (vi), следующей за стадией (v), жидкую фазу, полученную центрифугированием и/или фильтрацией, обрабатывают на стадии (vi.a), и/или твердый остаток обрабатывают на стадиях (vi.b), (vi.c), (vi.d) и (vi.e).

На предпочтительной стадии (vi.a) жидкую фазу, полученную на стадии (v), сушат, возможно концентрируют и сушат, чтобы получить гиалуроновую кислоту или ее соль, имеющую среднemasсовую молекулярную массу от 10 кДа до 600 кДа.

Жидкая фаза, подлежащая сушке, предпочтительно концентрированию и сушке на стадии (vi.a), предпочтительно не должна содержать осадков, если ее охлаждают до 20-25°C. Следовательно, при наличии осадка жидкую фазу, полученную на стадии (v), дополнительно центрифугируют и/или фильтруют перед стадией (vi.a).

Концентрирование центрифугированной и/или отфильтрованной жидкой фазы предпочтительно проводят при температуре от 60°C до 90°C, более предпочтительно от 65°C до 85°C, еще более предпочтительно от 70°C до 80°C, например, при 70°C, при 75°C или при 80°C. Помимо температуры, продолжительность стадии концентрирования также зависит от желаемого количества веществ, растворенных в жидкой фазе.

Концентрирование центрифугированной и/или отфильтрованной жидкой фазы предпочтительно обеспечивает увеличение количества растворенных веществ (включая НА) в жидкой фазе до диапазона от 1 г до 35 г на 100 мл жидкой фазы, предпочтительно от 5 до 25 г, еще более предпочтительно от 8 до 18 г.

Предпочтительно жидкая фаза, полученная на стадии (vi.a) концентрирования, имеет относительную плотность (определяемую как отношение [плотность центрифугированной и/или отфильтрованной жидкой фазы]:[плотность жидкой фазы в конце концентрирования]) составляет от 1,01 до 1,20, предпочтительно от 1,02 до 1,15, еще более предпочтительно от 1,05 до 1,08.

Предпочтительно концентрирование жидкой фазы проводят при пониженном давлении (ниже 0,1 МПа (1 атм.) при 25°C), более предпочтительно при давлении от -1,5 мПа до -0,1 мПа, еще более предпочтительно от -1,0 мПа до -0,5 мПа, например при -0,8 мПа.

Предпочтительно НА, полученная на стадии (vi.a), имеет чистоту (масс.% по отношению к общей массе НА) от 90 до 100%, предпочтительно от 95 до 99,5%, еще более предпочтительно от 97% до 99% (% определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

На предпочтительных стадиях (vi.b), (vi.c), (vi.d) и (vi.e) твердый остаток, полученный в результате центрифугирования и/или фильтрации на стадии (v), перерабатывают с получением хондроитинсульфата или соли, имеющих среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа.

На предпочтительной стадии (vi.b) твердый остаток, полученный центрифугированием и/или фильтрованием на стадии (v), извлекают и очищают с получением хондроитина или его соли (CS), имеющих среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа.

На предпочтительной стадии (vi.c) (стадия сульфирования (или сульфатирования), используемая как реакционная стадия, обеспечивающая введение сульфатной группы в димер хондроитина) после стадии (vi.b) твердый остаток обрабатывают источником серной кислоты (предпочтительно выбираемым из группы, включающей или, альтернативно, состоящим из серной кислоты, пиридинового комплекса триоксида серы, диметилформамидного комплекса триоксида серы и их смесей) с получением подкисленного продукта (где указанную стадию сульфирования осуществляют в соответствии с методикой и устройством, известными специалисту в данной области техники).

Количество источника серной кислоты, используемого на стадии (vi.c), является таким, чтобы получить массовое процентное содержание 6-хондроитинсульфата, составляющее от 51% до 99% или примерно $95 \pm 0,5\%$ (предпочтительно от 78% до 85% или 86%) по отношению к общему содержанию дисахаридов CS в твердом остатке со стадии (vi.b).

Предпочтительно на стадии (vi.c) используют от 1 до 50 мл диметилформамидного комплекса триоксида серы и (SO₃ДМФ), предпочтительно от 2 до 40 мл, еще более предпочтительно от 4 до 30 мл, на каждые 100 г хондроитина или его соли (CS), полученных на стадии (vi.b), например, 5 мл, 10 мл, 15 мл, 18 мл, 22 мл или 25 мл диметилформамидного комплекса триоксида серы на каждые 100 г хондроитина или его соли (CS), полученных на стадии (vi.b). Более предпочтительно диметилформамидный комплекс триоксида серы добавляют к хондроитину или его соли (CS), полученным на стадии (vi.b), в несколько стадий, например, добавляют от 2 мл до 8 мл, затем добавляют от 8 мл до 12 мл и, наконец, добавляют еще от 8 до 12 мл диметилформамидного комплекса триоксида серы.

Обработку на стадии (vi.c) проводят в течение периода времени от 1 минуты до 4 часов, предпочтительно от 10 минут до 120 минут, еще более предпочтительно от 20 минут до 60 минут, при температуре от 20°C до 80°C, предпочтительно от 30°C до 70°C,

еще более предпочтительно от 40°C до 60°C. На стадии (vi.d) продукт, полученный на стадии (vi.c), нейтрализуют основным агентом.

Следовательно, на стадии (vi.d) источник серной кислоты, все еще свободной в подкисленном продукте стадии (vi.c) (т.е. источник серной кислоты, не связанной с хондроитином в виде хондроитинсульфата в подкисленном продукте) удаляют путем нейтрализации основным агентом с получением нейтрализованного продукта.

В настоящем описании выражение «нейтрализованный» или «нейтрализация» используют для обозначения достижения значения pH от 6 до 8, предпочтительно от 6,4 до 7,6, еще более предпочтительно от 6,6 до 7,4, например, значения pH $7,0 \pm 0,2$.

Основной агент, используемый на стадии (vi.d), предпочтительно представляет собой неорганический основной агент.

Основной агент предпочтительно выбирают из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из: аммиака, гидроксида натрия, гидроксида калия и их смесей.

Предпочтительно гидроксид натрия, используемый на стадии (vi.d), имеет концентрацию 1 М, 2 М или 4 М.

На предпочтительной стадии (vi.e) после стадии (vi.d) нейтрализованный продукт, полученный на стадии (vi.d), концентрируют и сушат с получением хондроитинсульфата, имеющего среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа.

Концентрирование на стадии (vi.e) обеспечивает достижение относительной плотности (определяемой как отношение [плотность нейтрализованного продукта, полученного на стадии (vi.d)]:[плотность концентрированного продукта, полученного на стадии (vi.e)]), составляющей от 1,0 до 1,30, предпочтительно от 1,01 до 1,20, еще более предпочтительно от 1,05 до 1,15.

Предпочтительно концентрирование на стадии (vi.e) проводят посредством диализа и/или вакуумного концентрирования.

Более предпочтительно диализ проводят с помощью диализного мешка, чтобы удалить небольшие примеси, которые могут присутствовать.

Стадию концентрирования (vi.e) предпочтительно прекращают, когда содержание твердого вещества в концентрированном продукте, полученном на стадии (vi.e), составляет от 10 до 60 г на 100 мл, предпочтительно от 20 до 50 г на 100 мл, еще более предпочтительно от 35 г до 45 г на 100 мл, например, 40 г/100 мл.

Сушку на стадии (vi.e) проводят после концентрирования на стадии (vi.e), предпочтительно с помощью вакуумной печи.

Объектом настоящего изобретения является применение исходного растительного материала, предпочтительно гриба, более предпочтительно из подцарства Дикария, еще

более предпочтительно из отдела Базидиомикота, еще более предпочтительно из вида *Tremella fuciformis*, для получения гиалуроновой кислоты или ее соли (НА), соли аниона гиалуроната, и/или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат или его соль (CS).

Воплощения смеси, применения указанной смеси, композиции, содержащей указанную смесь в качестве добавки или эксципиента, или ингредиента (или неактивного ингредиента), применения композиции в качестве лекарственного средства, применения композиции при лечении конкретных расстройств, заболеваний или патологий, способа получения указанной смеси или указанной композиции, содержащей указанную смесь, применения указанной композиции в качестве добавки, эксципиента или ингредиента, а также вышеуказанного исходного растительного материала могут подвергаться - специалисты в данной области техники - замене или модификации в отношении описанных характеристик в соответствии с особыми ситуациями. Эти воплощения также следует рассматривать как включенные в объем охраны, сформулированный в нижеследующей формуле изобретения.

Кроме того, следует отметить, что любое воплощение может быть реализовано независимо от других описанных воплощений.

Воплощения настоящего изобретения (FRn) описаны ниже:

FRn. Смесь (M), содержащая или, альтернативно, состоящая из гликозаминогликанов, полученных из исходного растительного материала; указанный гликозаминогликан выбран из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из:

(a) гиалуроновой кислоты или ее соли, аниона гиалуроната (НА), имеющих среднемассовую молекулярную массу от 10 кДа до 600 кДа;

(b) хондроитина или его соли (CS), такой как хондроитинсульфат, имеющих среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа;

(c) сочетания (a) и (b).

FR2. Смесь (M) по предшествующему FR, в которой:

(a) гиалуроновая кислота или ее соль (НА) имеет среднемассовую молекулярную массу от 100 до 500 кДа, предпочтительно от 200 до 400 кДа, и/или

(b) хондроитин или его соль (CS) имеет среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа, предпочтительно от 3 кДа до 40 кДа, еще более предпочтительно от 5 кДа до 25 кДа.

FR3. Смесь (M) по любому из предшествующих FR, в которой указанный исходный растительный материал представляет собой гриб, предпочтительно из подцарства Дикария, еще более предпочтительно из отдела Базидиомикота.

FR4. Смесь (M) по предшествующему FR, в которой гриб относится к виду *Tremella fuciformis*.

FR5. Применение смеси (M) по любому из предшествующих FR в качестве добавки, эксципиента или ингредиента при получении фармацевтических продуктов, медицинских устройств, нутрицевтических продуктов, пищевых продуктов для специальных медицинских целей (FSMP), пищевых добавок или пищевых продуктов.

FR6. Композиция, включающая: (i) смесь по любому из FR1-4 и (ii) технологические добавки или эксципиенты фармацевтического или пищевого качества.

FR7. Композиция по предшествующему FR для применения в качестве лекарственного средства.

FR8. Композиция по FR6 для применения в профилактическом или радикальном лечении людей или животных, имеющих конкретные расстройства или заболевания, или патологии, выбранные из артрита, остеоартрита, артроза, болей в суставах, воспалений конечностей и суставов или гастроэзофагеального рефлюкса, и/или для применения в качестве добавки, эксципиента или ингредиента при получении фармацевтических продуктов, продуктов для медицинских устройств, нутрицевтических продуктов, пищевых продуктов специального медицинского назначения (FSMP), пищевых продуктов или пищевых добавок.

FR9. Способ получения гиалуроновой кислоты или гиалуроната (HA) и/или хондроитинсульфата или хондроитина (CS), включающий по меньшей мере одну стадию экстракции гиалуроновой кислоты или гиалуроната и/или хондроитинсульфата или хондроитина из исходного материала растительного происхождения.

FR10. Способ по предшествующему FR, включающий следующие стадии:

(i) идентификация одного или более натуральных грибов в качестве исходного растительного материала для гликозаминогликана;

(ii) возможно дробление или измельчение исходного растительного материала;

(iii) экстракция указанного гликозаминогликана из исходного растительного материала, полученного на стадии (i) или на стадии (ii), растворителем для экстракции, предпочтительно водным растворителем, еще более предпочтительно водой, с получением водного экстракта указанного гликозаминогликана;

(iv) добавление растворителя, предпочтительно этанола, к водному экстракту, полученному на стадии (iii), с получением жидкого продукта;

(v) центрифугирование и/или фильтрация жидкого продукта, полученного на стадии (iv), с получением жидкой фазы и твердого остатка;

(vi) обработка жидкой фазы, полученной в результате центрифугирования и/или фильтрации на стадии (v), посредством следующей стадии (vi.a) и/или обработка твердого остатка, полученного в результате центрифугирования и/или фильтрации на стадии (v) с помощью следующих стадий (vi.b), (vi.c), (vi.d) и (vi.e):

(vi.a) сушка, предпочтительно концентрирование и сушка жидкой фазы, полученной на стадии (v), с получением гиалуроновой кислоты или ее соли со среднемассовой молекулярной массой от 10 кДа до 600 кДа, и/или

(vi.b) извлечение и очистка твердого остатка, полученного на стадии (v), с получением хондроитина или его соли (CS), имеющих среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа;

(vi.c) обработка хондроитина или его соли (CS), полученных на стадии (vi.b), источником серной кислоты, предпочтительно выбираемым из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из серной кислоты, пиридинового комплекса триоксида серы, диметилформамидного комплекса триоксида серы и их смесей, с получением подкисленного продукта;

(vi.d) нейтрализация подкисленного продукта, полученного на стадии (vi.c), с использованием основного агента с получением нейтрализованного продукта;

(vi.e) концентрирование и сушка нейтрализованного продукта, полученного на стадии (vi.d), с получением хондроитинсульфата, имеющего среднемассовую молекулярную массу от 1 кДа до 50 кДа.

FR11. Применение исходного растительного материала, предпочтительно гриба, более предпочтительно из подцарства Дикария, еще более предпочтительно из отдела Базидиомикота, еще более предпочтительно из вида *Tremella fuciformis*, для получения гиалуроновой кислоты или ее соли, соли аниона гиалуроната и /или хондроитина или его соли, такой как хондроитинсульфат.

Второе воплощение (сокращенно P2) способа по настоящему изобретению относится к способу получения гиалуроновой кислоты или ее соли (НА), включающему или, альтернативно, состоящему из следующих стадий:

(i) идентификация одного или более натуральных грибов в качестве исходного растительного материала для гиалуроновой кислоты; например, одного или более натуральных грибов в сухом или высушенном виде, предпочтительно включающих или, альтернативно, состоящих из по меньшей мере одного гриба, принадлежащего к подцарству Дикария, предпочтительно к отделу Базидиомикота, более предпочтительно к виду *Tremella fuciformis*;

(ii) возможно осуществление дробления или измельчения исходного растительного материала (распределение среднего размера частиц предпочтительно составляет от 500 мкм до 1800 мкм, предпочтительно от 700 мкм до 1000 мкм, например, примерно 20 меш = 841 мкм);

(pre-iii) проведение ферментативного гидролиза исходного растительного материала, полученного на стадии (i) или стадии (ii), в водном растворителе для гидролиза, предпочтительно в воде, при температуре от 10°C до 90°C, где к исходному растительному материалу, диспергированному в объеме растворителя для гидролиза, добавляют фермент, предпочтительно протеолитический фермент, с получением смеси стадии (pre-iii);

(iii) экстрагирование указанной смеси со стадии (pre-iii) водным растворителем для экстракции, предпочтительно водой, при температуре от 91°C до 110°C, предпочтительно от 95°C до 110°C, еще более предпочтительно от 98°C до 105°C (например, примерно 100°C или температура кипения растворителя для экстракции) с получением водного экстракта;

(iv) добавление растворителя для осаждения (осаждение путем добавления растворителя), предпочтительно спиртового растворителя, более предпочтительно этанола, к водному экстракту, полученному на стадии (iii), с получением жидкого продукта стадии (iv); предпочтительно осаждение этанолом путем медленного добавления 95% этанола к указанному водному экстракту, полученному на стадии (iii), при соотношении объем/объем от 2 до 4, предпочтительно 3, и выдерживание при перемешивании в течение периода времени, составляющего от 8 часов до 16 часов, например, около 12 часов;

(vii) обработка указанного жидкого продукта со стадии (iv) путем использования стадии (vii.a) и, возможно, стадии (vii.b):

(vii.a) удаление указанного растворителя для осаждения (например, перегонкой или нагреванием при значении давления ниже давления окружающей среды), предпочтительно этанола, с получением жидкого продукта стадии (vii.a);

(vii.b) добавление воды к указанному жидкому продукту стадии (vii.a) (например, для растворения твердых продуктов) с получением жидкого продукта стадии (vii.b);

(viii) сушка указанного жидкого продукта со стадии (vii.b), предпочтительно концентрирование и/или сушка (например, удаление воды и возможного остаточного растворителя для осаждения (например, этанола) путем концентрирования, и/или сушки, и/или лиофильной сушки, предпочтительно лиофильной сушки) с получением продукта PR1, содержащего или, альтернативно, состоящего из гиалуроновой кислоты или ее соли,

имеющих среднemasсовую молекулярную массу от 10 кДа до 600 кДа, предпочтительно от 50 кДа до 350 кДа, более предпочтительно от 100 кДа до 300 кДа, и чистота составляет от 85% до примерно 100% по отношению к общей массе указанного продукта PR1, предпочтительно от 95% до 99,5%, еще более предпочтительно от 97% до 99% (% определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Третье воплощение (сокращенно P3) способа по настоящему изобретению относится к способу получения хондроитинсульфата, предпочтительно 6-хондроитинсульфата, включающему или, альтернативно, состоящему из следующих стадий:

(i) идентификация одного или более натуральных грибов в качестве исходного растительного материала для гиалуроновой кислоты; например, одного или более натуральных грибов в сухом или высушенном виде, предпочтительно включающих или, альтернативно, состоящих из по меньшей мере одного гриба, принадлежащего к подцарству Дикария, предпочтительно к отделу Базидиомикота, более предпочтительно к виду *Tremella fuciformis*;

(ii) возможно проведение дробления или измельчения исходного растительного материала (распределение среднего размера частиц предпочтительно составляет от 500 мкм до 1800 мкм, предпочтительно от 700 мкм до 1000 мкм, например, примерно 20 меш = 841 мкм);

(pre-iii) проведение ферментативного гидролиза исходного растительного материала, полученного на стадии (i) или стадии (ii), в водном растворителе для гидролиза, предпочтительно в воде, при температуре от 10°C до 90°C, где к исходному растительному материалу, диспергированному в объеме растворителя для гидролиза, добавляют фермент, предпочтительно протеолитический фермент, с получением смеси на стадии (pre-iii);

(iii) экстрагирование указанной смеси со стадии (pre-iii) водным растворителем для экстракции, предпочтительно водой, при температуре от 91°C до 110°C, предпочтительно от 95°C до 110°C, еще более предпочтительно от 98°C до 105°C (например, примерно 100°C или температура кипения растворителя для экстракции), с получением водного экстракта;

(vi.c) обработка источником серной кислоты (стадия сульфирования) указанного водного экстракта с получением жидкого продукта стадии (vi.c), где указанный источник серной кислоты предпочтительно выбирают из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из серной кислоты, пиридинового комплекса триоксида серы,

диметилформамидного комплекса триоксида серы и их смесей; более предпочтительным является диметилформамидный комплекс триоксида серы (SO_3 -ДМС);

(vi.d) нейтрализация указанного жидкого продукта со стадии (vi.c) путем добавления основания до нейтрального pH с получением нейтрализованного продукта, при этом указанное основание предпочтительно представляет собой неорганическое основание, более предпочтительно NaOH или KOH, или $\text{Ca}(\text{OH})_2$, или $\text{Mg}(\text{OH})_2$;

(vi.e) концентрирование и сушка указанного нейтрализованного продукта, полученного на стадии (vi.d), с получением продукта PR2, содержащего или, альтернативно, состоящего из хондроитинсульфата или его соли (сокращенно CS), имеющих среднюю молекулярную массу от 1 кДа до 45 кДа или 50 кДа (или от более 5 кДа до менее 50 кДа), предпочтительно от 3 кДа до 40 кДа, еще более предпочтительно от 5 кДа или более 5 кДа до 25 кДа или от 5 кДа или более 5 кДа до 10 кДа, например, примерно 5 кДа, или 6 кДа, или 7 кДа, или 8 кДа, или 9 кДа, или 10 кДа.

Выражение «хондроитинсульфат или его соль (сокращенно CS)», получаемый по указанному третьему воплощению (P3) способа по настоящему изобретению, используется для обозначения сочетания несulfатированного хондроитина и моно-, ди- и/или три-сульфатированного хондроитина в различных возможных положениях, предпочтительно преимущественно 6-хондроитинсульфата.

В качестве альтернативы, выражение «хондроитинсульфат или его соль (сокращенно CS)», получаемый по указанному третьему воплощению (P3) способа по настоящему изобретению, используется для обозначения группы из моно-, ди- и/или три-сульфатированного хондроитина в различных возможных положениях, предпочтительно преимущественно 6-хондроитинсульфата.

Предпочтительно указанный хондроитинсульфат (CS), получаемый по указанному третьему воплощению способа по настоящему изобретению (P3), имеет среднюю молекулярную массу в описанных диапазонах (предпочтительно от 5 кДа или более 5 кДа до 10 кДа, например, примерно 6 кДа, или 7 кДа, или 8 кДа, или 9 кДа), содержит 6-хондроитинсульфат в массовом процентном содержании от 51% до примерно $95 \pm 0,5\%$, предпочтительно от 75% до 90%, еще более предпочтительно от 78% до 86% по отношению к общей массе указанного хондроитинсульфата (CS) (или по отношению к общей массе дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате), и он имеет чистоту от 80% до 99,99% (например, 94,5%, 94,6%, 94,7%, 94,8% или 94,9%) по отношению к общей массе продукта PR2, полученного на стадии (vi.e), предпочтительно от 85% до 98% (например, 86%, 87%, 88%, 89% или 89,5%), еще более предпочтительно, от 90% до

94,9%, например, 91%, 92%, 93%, 94% или 94,5% (% определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Еще более предпочтительно указанный хондроитинсульфат (CS), получаемый по указанному третьему воплощению (P3) способа по настоящему изобретению, имеет среднемассовую молекулярную массу в описанных диапазонах (предпочтительно от 5 кДа или более 5 кДа до 10 кДа, например, примерно 6 кДа, или 7 кДа, или 8 кДа, или 9 кДа), содержит 6-хондроитинсульфат в массовом процентном содержании от 51% до примерно 95±0,5% (предпочтительно от 75% до 90%, более предпочтительно от 78% до 86%), и 4-хондроитинсульфат в массовом процентном содержании от 0,01% до примерно 5% (предпочтительно от 0,05% до 3%, более предпочтительно от 0,1% до 1,5%) по отношению к общей массе указанного хондроитинсульфата (CS) (или по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате), и он имеет чистоту от 80% до 99,99% по отношению к общей массе продукта PR2, полученного на стадии (vi.e.), предпочтительно от 85% до 98% (например, 86%, 87%, 88% или 89%), более предпочтительно от 90% до 95%, например, 91%, 92%, 93%, 94% или 94,5% (% определяют, например, с помощью ВЭЖХ).

Среднемассовую молекулярную массу HA и/или CS можно рассчитать в соответствии с методами и инструментами, общепринятыми и известными специалистам в данной области техники, например, с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ); предпочтительно среднемассовая молекулярная масса HA и/или CS может быть определена с помощью ВЭЭХ, снабженной интегрированным специализированным программным обеспечением для гель-проникающей хроматографии (ГПХ).

На стадии (pre-iii) ферментативного гидролиза, присутствующей во втором и третьем воплощениях (P2 и P3) способа по настоящему изобретению, фермент (например, пектиназу, и/или целлюлазу, и/или протеиназу) добавляют к исходному растительному материалу, как описано в настоящем изобретении, в объеме растворителя для гидролиза (например, водного растворителя или воды), в 25-100 раз превышающем массу исходного растительного материала, предпочтительно в 35-75 раз, более предпочтительно в 45-55 раз (например, в 50 раз), и нагревают при температуре от 10°C до 90°C, предпочтительно от 20°C до 65°C, более предпочтительно от 45°C до 55°C (например, примерно 50°C), в течение периода времени от 0,5 до 12 часов, предпочтительно от 1 до 8 часов, еще более предпочтительно от 2 до 6 часов (например, примерно 4 часов), с получением указанной смеси стадии (pre-iii) для проведения стадии (iii) экстракции или первой стадии (iii.a) экстракции (как описано далее).

Кроме того, указанную стадию (pre-iii) ферментативного гидролиза преимущественно осуществляют при значении pH раствора для ферментативного гидролиза от 2 до 9, предпочтительно от 3 до 5 или от 5 до 8, более предпочтительно от 3 до 4 (например, 3,5) или от 6 до 7, и/или на указанной стадии (pre-iii) ферментативного гидролиза количество фермента (водный раствор фермента с концентрацией 1%-20%, или 2%-10%, или 3%-6% масс./масс. или масс./об.) используют в объемном процентном содержании от 0,001% до 1%, предпочтительно от 0,005% до 0,1%, более предпочтительно от 0,008% до 0,05% (например, 0,01) по отношению к массе экстрагируемого исходного растительного материала (об./масс.) или, альтернативно, по отношению к объему раствора исходного растительного материала, экстрагируемого растворителем для гидролиза (об./об.).

В соответствии с предпочтительным примером стадию (pre-iii) ферментативного гидролиза проводят при следующих условиях (приблизительно): объем 0,01%; температура 50°C; фактический pH 3,5; продолжительность 4 часа.

Указанный фермент, используемый на стадии (pre-iii) второго и/или третьего воплощения (P2 и/или P3), может представлять собой пектиназу, и/или целлюлазу, и/или протеиназу.

Примерами ферментов, используемых в способе по настоящему изобретению, являются:

- товарный продукт Pectinex® Ultra Tropical, состав: фермент: пектинлиаза или пектиназа; консерванты: сорбат калия; стабилизаторы: сахароза, глицерин, сорбит, хлорид натрия, хлорид калия; активность соединения: пектинлиаза или пектиназа (PECTU) = 5000 PECTU/г; приблизительная плотность 1,18 (г/мл); пектинлиаза представляет собой фермент, который катализирует расщепление сложного метилового эфира (1,4)-альфа-D-галактуроновой кислоты с образованием олигосахаридов с 4-дезоксигалактуронидными группами на их нередуцирующих концах; другие активности: целлюлазная, полигалактуроназная, бета-глюканазная (эндо-1,3(4)-).

- коммерческий продукт Pectinex® Ultra SP-L, состав, масс./масс. %: 45% глицерина (CAS № 56-81-5), 45% воды (CAS № 7732-18-5), 5% полигалактуроназы (CAS № 9032-75-1, определяется как концентрация фермента (в пересчете на сухую массу)), 5% хлорида калия (CAS № 7447-40-7); активность соединения: полигалактуроназа (PGNU) = 3300 PGNU/г; приблизительная плотность 1,17 (г/мл); полигалактуроназа представляет собой фермент, гидролизующий (1,4)-альфа-D-галактозидуроновые связи в пектате и других галактуронанах.

- коммерческий продукт Viscozyme®, состав, масс./масс. %: 56,8% воды (CAS № 7732-18-5), 9% бета-глюканазы (эндо-1,3(4)-) (CAS № 62213-14-3; определяется как концентрация фермента (в пересчете на сухую массу)), 24% сахарозы (CAS № 57-50-1), 10% хлорида натрия (CAS № 7647-14-5), 0,20% сорбата калия (CAS № 24634-61-5); активность соединения: бета-глюканаза (эндо-1,3(4)-) (FGB) = 100 FGB /г; приблизительная плотность 1,21 (г/мл); эндо-бета-глюканаза представляет собой фермент, гидролизующий (1,3)- или (1,4)-связи в бета-D-глюканах, другие активности: ксиланазная, целлюлазная, гемицеллюлазная.

Во втором и третьем воплощениях (P2 и/или P3) способа по настоящему изобретению стадия экстракции (iii) предпочтительно включает или, альтернативно, состоит из первых стадий (iii.a) экстракции, включающих или, альтернативно, состоящих из экстракции первым объемом растворителя для экстракции при температуре от 91°C до 110°C (например, примерно 100°C) или при температуре кипения растворителя для экстракции в течение периода времени от 0,5 часов до 12 часов, предпочтительно от 1 часа до 9 часов, более предпочтительно от 1 часа до 4 часов (например, примерно 2 часа или 3 часа) с получением первого водного экстракта; с последующей второй стадией (iii.b) экстракции, включающей или, альтернативно, состоящей из экстракции вторым объемом растворителя для экстракции при температуре от 90°C до 110°C (например, при 100°C) или при температуре кипения растворителя для экстракции в течение периода времени от 0,5 часов до 8 часов, предпочтительно от 0,5 часов до 4 часов, более предпочтительно от 1 часа до 3 часов (например, 1,5 часа, или 2 часа, или 2,5 часа), с получением второго водного экстракта; указанный первый экстракт и указанный второй экстракт объединяют с получением конечного водного экстракта; и, возможно, следует стадия (iii.c) концентрирования указанного конечного водного экстракта с получением концентрированного водного экстракта.

Во втором и третьем воплощениях (P2 и P3) способа по настоящему изобретению, предпочтительно, при первой экстракции (iii.a) используют первый объем растворителя для экстракции, превышающий в 25-100 раз массу исходного растительного материала, предпочтительно в 35-65 раз, еще более предпочтительно в 45-55 раз, например, в 50 раз. Например, указанный объем первой экстракции, превышающий в 25-100 раз массу исходного растительного материала, добавляют к объему растворителя для ферментативного гидролиза, достигая общего объема растворителя, превышающего в 50-200 раз массу растительного материала (например, примерно в 100 раз).

Во втором и третьем воплощениях (P2 и P3) способа по настоящему изобретению, предпочтительно при второй экстракции (iii.b) используют второй объем растворителя для

экстракции, который в 25-75 раз превышает массу исходного растительного материала, предпочтительно в 35-65 раз, более предпочтительно в 45- 55 раз (например, примерно в 50 раз).

Во втором и третьем воплощениях (P2 и P3) способа по настоящему изобретению после первой стадии (iii.a) экстракции проводят фильтрацию стадии (iii.a): фильтрат соответствует первому водному экстракту, полученному на стадии (iii.a), а остаток подвергают второй стадии (iii.b) экстракции. После второй стадии (iii.b) экстракции проводят стадию (iii.b) фильтрации, и фильтрат соответствует второму водному экстракту, полученному на стадии (iii.b). Например, указанную фильтрацию на стадии (iii.a) и (iii.b) (или фильтрацию на стадии (iii) экстракции) проводят с фильтрами от 140 до 270 меш, предпочтительно 200 меш. Возможно, в указанных втором и третьем воплощениях (P2 и P3) первый водный экстракт, полученный на стадии (iii.a), и второй водный экстракт, полученный на стадии (iii.b), объединяют и подвергают стадии (iii.c) вакуумного концентрирования, например, при температуре от 60°C до 90°C, предпочтительно от 70°C до 80°C, более предпочтительно примерно при 75°C, до относительной плотности примерно от 0,8 до 1,5, предпочтительно от 1,00 до 1,20 (например, примерно 1,05-1,08).

В третьем воплощении (P3) способа по настоящему изобретению, предпочтительно на стадии (vi.c) (стадия сульфирования) используют от 1 мл до 50 мл диметилформамидного комплекса триоксида серы (SO₃ ДМФ), предпочтительно от 2 до 40 мл, еще более предпочтительно от 4 до 30 мл, на каждые 100 г хондроитина или его соли (CS), полученных на стадии (vi.b), например, примерно 5 мл, 10 мл, 15 мл, 18 мл, 22 мл или 25 мл диметилформамидного комплекса триоксида серы на каждые 100 г хондроитина или его соли (CS), полученных на стадии (vi.b). Более предпочтительно диметилформамидный комплекс триоксида серы добавляют к хондроитину или его соли (CS), полученным на стадии (vi.b), в несколько стадий, например, добавляют от 2 мл до 8 мл, затем добавляют от 8 мл до 12 мл и, наконец, добавляют еще от 8 до 12 мл диметилформамидного комплекса триоксида серы. Обработку на стадии (vi.c) проводят в течение периода времени от 1 минуты до 4 часов, предпочтительно от 10 минут до 120 минут, еще более предпочтительно от 20 минут до 60 минут (например, примерно 30 минут), при температуре от 20°C до 80°C, предпочтительно от 30°C до 70°C, еще более предпочтительно от 40°C до 60°C (например, примерно 50°C). В соответствии с предпочтительным примером указанную стадию (vi.c) сульфирования проводят путем добавления к примерно 100 мл водного экстракта, полученного на стадии (iii), или (iii.b), или (iii.c) (содержание твердого вещества 10-15 г/100 мл и относительная плотность 1,05-1,08) SO₃ДМФ (5 мл, 15 мл, 25 мл) при температуре от 40°C до 60°C (например, при 50°C)

и в течение периода времени, составляющего от 20 минут до 60 минут (например, 30 минут).

В третьем воплощении (P3) способа по настоящему изобретению предпочтительно основной агент, используемый на стадии (vi.d), предпочтительно представляет собой неорганический основной агент, выбираемый из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из: аммиака, гидроксида натрия, гидроксида калия и их смеси, предпочтительным является гидроксид натрия (например, в концентрации 1 М, 2 М или 4 М).

В третьем воплощении (P3) способа по настоящему изобретению указанная стадия (vi.e) предпочтительно включает мембранную фильтрацию посредством диализа, например, с помощью диализного мешка 1000 Да, в течение периода времени, составляющего от 18 до 36 часов, предпочтительно 24 часа, до достижения относительной плотности от 1,3 до 1,5, предпочтительно примерно 1,1, с последующей сушкой, например, в вакуумной печи.

Согласно одному аспекту изобретения, в указанном первом и третьем воплощениях (P1 и P3) способа по настоящему изобретению хондроитинсульфат или его соль (CS) по настоящему изобретению имеют среднюю молекулярную массу от более 5 кДа до менее 50 кДа, предпочтительно от более 5 кДа до 25 кДа, и содержат:

- 6-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 50% до 95±0,5%, предпочтительно от 75% до 90%;
- несulfатированный хондроитин при массовом процентном содержании от 5% до 20%, предпочтительно от 7% до 15%;
- 2,6-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,1% до 10%, предпочтительно от 0,2% до 8%, и
- 4-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, причем все проценты выражены по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате, или по отношению к общей массе хондроитинсульфата.

В соответствии с предпочтительным аспектом изобретения хондроитинсульфат или его соль (CS) по настоящему изобретению (способ P1 и/или P3) имеют среднюю молекулярную массу от более чем 5 кДа до 10 кДа, и указанный хондроитинсульфат или его соль содержат:

- 6-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 78% до 86%;
- несulfатированный хондроитин при массовом процентном содержании от 8% до 13%;

- 2,6-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,3% до 5% и

- 4-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 0,1% до 1,5%, причем все проценты выражены по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате, или по отношению к общей массе хондроитинсульфата.

Согласно еще одному аспекту изобретения хондроитинсульфат или его соль (CS) по настоящему изобретению (способ P1 и/или P3) имеют среднемассовую молекулярную массу от более 5 кДа до менее 50 кДа, предпочтительно от более 5 кДа до менее 25 кДа, и указанный хондроитинсульфат или его соль содержат:

- 6-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 50% до 95±0,5%, предпочтительно от 75% до 90%, и

- 4-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, причем все проценты выражены по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате, или по отношению к общей массе хондроитинсульфата.

В соответствии с еще одним еще более предпочтительным аспектом изобретения хондроитинсульфат или его соль (CS) по настоящему изобретению (способ P1 и/или P3) имеют среднемассовую молекулярную массу от более 5 кДа до 10 кДа, и при этом указанный хондроитинсульфат или его соль содержат:

- 6-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 78% до 86% и

- 4-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 0,1% до 1,5%, причем все проценты выражены по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате, или по отношению к общей массе хондроитинсульфата.

В соответствии с еще одним предпочтительным аспектом изобретения хондроитинсульфат или его соль (CS) по настоящему изобретению (способ P1 и/или P3) имеют среднемассовую молекулярную массу от более 5 кДа до менее 50 кДа, предпочтительно от более 5 кДа до менее 25 кДа, и содержат:

- 6-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 50% до 95±0,5%, предпочтительно от 75% до 90%;

- несульфатированный хондроитин при массовом процентном содержании от 5% до 20%, предпочтительно от 7% до 15%;

- 2,6-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,1% до 10%, предпочтительно от 0,2% до 8%;

- 4-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%;

- 4,6-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, и

- 2,4-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,01% до 5%, предпочтительно от 0,05% до 3%, причем все проценты выражены по отношению к общему количеству дисахаридов, содержащихся в хондроитинсульфате, или по отношению к общей массе хондроитинсульфата.

Согласно одному воплощению хондроитинсульфат или его соль (CS) по настоящему изобретению (способ P1 и/или P3) имеют среднемассовую молекулярную массу от более 5 кДа до 10 кДа, и указанный хондроитинсульфат или его соль содержат:

- 6-хондроитинсульфат при массовом процентном содержании от 78% до 86%;

- несульфатированный хондроитин при массовом процентном содержании от 8% до 13%;

- 2,6-хондроитиндисульфат при массовом процентном содержании от 0,3% до 5% и, кроме того,

- 4-хондроитинсульфат, 4,6-хондроитиндисульфат и 2,4-хондроитиндисульфат, массовое процентное содержание каждого из которых составляет от 0,1% до 1,5%.

Экспериментальная часть

I. Способ получения гиалуроновой кислоты согласно второму воплощению (P2)

(i) подготавливают высушенные грибы, принадлежащие к виду *Tremella fuciformis*,

(ii) осуществляют дробление или измельчение указанных сухих грибов (примерно 20 меш) путем размола с получением дробленых/измельченных сухих грибов;

(pre-iii) осуществляют ферментативный гидролиз с использованием пектиназы в качестве фермента, путем добавления к дробленным/измельченным сухим грибам и к ферменту пектиназе (Pectinex® Ultra Tropical, объем 0,01%) дистиллированной воды (50 об./масс.) и нагревают примерно при 50°C в течение примерно 3 часов с получением гидролизной смеси;

(iii.a) проводят первую экстракцию путем добавления дистиллированной воды (50 об./масс.) к указанной гидролизной смеси и нагревания при температуре примерно 100°C (кипение) в течение примерно 2,5 часов, фильтруют через сито 200 меш и собирают фильтрат и твердый остаток;

(iii.b) проводят вторую экстракцию указанного твердого остатка, полученного в результате указанной первой экстракции (iii.a) путем добавления дистиллированной воды

(50 об./масс.) и нагревания примерно до 100°C (кипячение) в течение примерно 2 часов с последующим фильтрованием через сито 200 меш и сбором фильтрата, и фильтрат, полученный в результате указанной первой экстракции (iii.a), объединяют с фильтратом, полученным в результате указанной второй экстракции (iii.b), с получением водного экстракта;

(iii.c) концентрируют указанный водный экстракт при температуре примерно 75°C с получением концентрированного водного экстракта, имеющего относительную плотность примерно 1,05; после чего

(iv) к указанному концентрированному водному экстракту медленно добавляют при перемешивании 95% этанол (объем/объем = 3) и оставляют на 12 часов; удаляют этанол и сохраняют экстракт;

(vii) к указанному экстракту добавляют дистиллированную воду и проводят лиофилизацию с получением продукта PR1, содержащего или, альтернативно, состоящего из гиалуроновой кислоты или ее соли (НА), имеющих среднюю молекулярную массу от 100 кДа до 300 кДа и чистоту в массовом процентном содержании от 95% до 99% по отношению к общей массе указанного продукта PR1.

II. Способ получения хондроитинсульфата согласно третьему воплощению (P3)

(i) подготавливают высушенные грибы, принадлежащие к виду *Tremella fuciformis*,

(ii) осуществляют дробление или измельчение указанных сухих грибов (примерно 20 меш) путем размола с получением дробленых/измельченных сухих грибов;

(pre-iii) проводят ферментативный гидролиз с использованием пектиназы в качестве фермента путем добавления к дробленным/измельченным сухим грибам и к ферменту пектиназе (Pectinex® Ultra Tropical, объем 0,01%) дистиллированной воды (50 об./масс.) и нагревают примерно при 50°C в течение примерно 2 часов с получением гидролизной смеси (pH 5-7);

(iii.a) проводят первую экстракцию путем добавления дистиллированной воды (50 об./масс.) к гидролизной смеси и нагревают при 100°C (кипячение) в течение примерно 2,5 часов с последующей фильтрацией через сито 200 меш (при необходимости центрифугируют перед фильтрованием) и собирают фильтрат и твердый остаток;

(iii.b) проводят вторую экстракцию указанного твердого остатка, полученного в результате указанной первой экстракции, путем добавления дистиллированной воды (50 об./масс.) и нагревают при 100°C (кипячение) в течение примерно 1,5 часов с последующим фильтрованием через сито 200 меш и сбором фильтрата, и указанный фильтрат, полученный в результате указанной первой экстракции (iii.a), объединяют с

указанным фильтратом, полученным в результате указанной второй экстракции (iii.b), с получением водного экстракта;

(iii.c) концентрируют указанный водный экстракт при температуре примерно 75°C с получением концентрированного водного экстракта, имеющего относительную плотность примерно 1,05-1,08, после чего

(vi.c) проводят реакцию сульфирования (или сульфатирования) путем добавления SO₃ ДМФ в количестве 5 мл, 15 мл, 55 мл на каждые 100 мл концентрированного водного экстракта при температуре примерно 75°C в течение примерно 30 минут;

(vi.d) нейтрализуют с помощью NaOH примерно до значения pH 7;

(vi.e) помещают полученный раствор в диализный мешок (1000 Да) по меньшей мере на 24 часа, пока не будет достигнута относительная плотность раствора примерно 1,1. Сушат в вакуумной печи с получением продукта PR2, содержащего или, альтернативно, состоящего из хондроитинсульфата или его соли (CS), имеющего среднюю молекулярную массу от более 5 кДа до 10 кДа (например, примерно 8 кДа), где указанный CS имеет состав, аналогичный соединению CS.1, указанному в таблице 1, и чистота в массовых процентах составляет от 89% до 94,5% по отношению к общей массе указанного продукта PR2.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гиалуроновой кислоты или ее соли, включающий следующие стадии:

(i) идентификация материала растительного происхождения, включающего или, альтернативно, состоящего из по меньшей мере одного гриба, принадлежащего к подцарству Дикария, предпочтительно к отделу Базидиомикота - *Basidiomycota*;

(ii) возможно проведение дробления или измельчения исходного растительного материала с получением указанного дробленого или измельченного исходного материала растительного происхождения;

(pre-iii) проведение ферментативного гидролиза указанного исходного растительного материала, полученного на стадии (i) или стадии (ii), в водном растворителе для гидролиза, предпочтительно в воде, при температуре от 10°C до 90°C, где к исходному растительному материалу, диспергированному в объеме растворителя для гидролиза, добавляют фермент, предпочтительно протеолитический фермент, с получением смеси стадии (pre-iii);

(iii) проведение экстракции указанного материала растительного происхождения, содержащегося в указанной смеси стадии (pre-iii), водным растворителем для экстракции, предпочтительно водой, при температуре от 91°C до 110°C или при температуре кипения с получением водного экстракта;

(iv) добавление растворителя для осаждения, предпочтительно спирта, к водному экстракту, полученному на стадии (iii), с получением жидкого продукта;

(vii) проведение обработки жидкого продукта, полученного на стадии (iv), путем осуществления стадии (vii.a) и, возможно, стадии (vii.b):

(vii.a) удаление указанного растворителя для осаждения из указанного жидкого продукта, полученного на стадии (iv), предпочтительно путем нагревания при давлении ниже комнатной температуры, где комнатная температура составляет от 15°C до 25°C;

(vii.b) разбавление путем добавления воды;

(viii) сушка, предпочтительно концентрирование и сушка, с получением продукта PR2, содержащего или, альтернативно, состоящего из гиалуроновой кислоты или ее соли, имеющих среднюю молекулярную массу от 10 кДа до 600 кДа.

2. Способ по п.1, в котором указанный по меньшей мере один гриб относится к виду *Tremella fuciformis* (Berk. 1856).

3. Способ по п.1 или п.2, в котором на указанной стадии (pre-iii) указанный фермент выбирают из группы, включающей или, альтернативно, состоящей из: пектиназы, целлюлазы, протеиназы и их смеси.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором стадия (iii) экстракции включает или, альтернативно, состоит из следующих стадий:

(iii.a) проведение первой экстракции указанного материала растительного происхождения, содержащегося в указанной смеси стадии (pre-iii), с использованием первого объема растворителя для экстракции при температуре от 91°C до 110°C или при температуре кипения в течение периода времени, составляющего от 0,5 часов до 12 часов, с получением первого водного экстракта и твердого остатка; затем

(iii.b) проведение второй экстракции указанного твердого остатка, полученного на стадии (iii.a), вторым объемом растворителя для экстракции при температуре от 90°C до 110°C в течение периода времени, составляющего от 0,5 часов до 8 часов, с получением второго водного экстракта, и объединение указанного первого экстракта и указанного второго экстракта с получением второго водного экстракта, и возможно

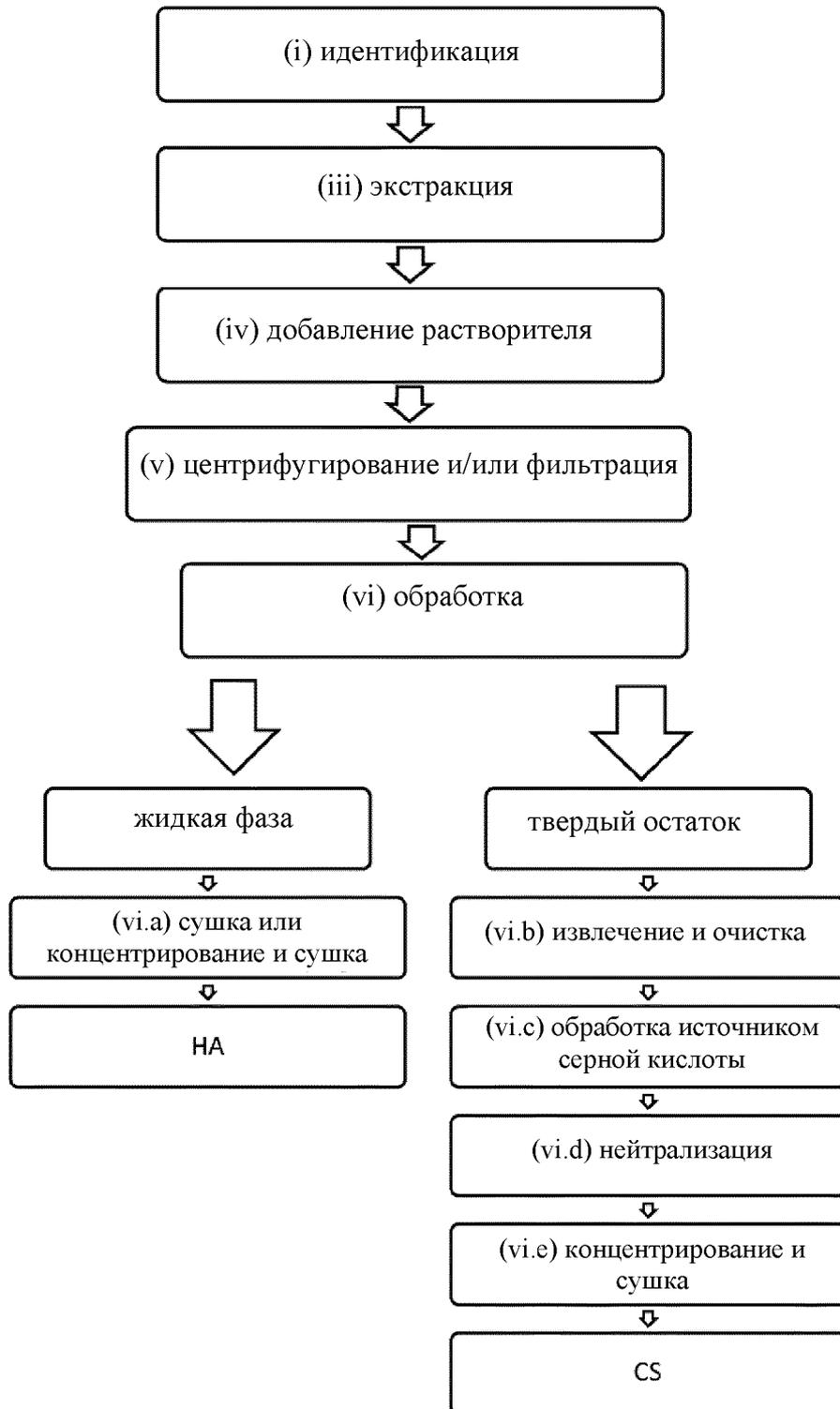
(iii.c) концентрирование указанного первого водного экстракта и второго водного экстракта с получением концентрированного водного экстракта.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором на указанной стадии (pre-iii) ферментативного гидролиза к исходному растительному материалу добавляют количество водного растворителя, предпочтительно воды, превышающее массу исходного растительного материала, масса/масса, в 25-100 раз, предпочтительно в 35-75 раз, указанный фермент добавляют в процентном объемном содержании от 0,001 до 1%, предпочтительно от 0,005 до 0,01%, и полученную смесь нагревают до температуры от 10°C до 90°C, предпочтительно от 20°C до 65°C, в течение периода времени от 0,5 часов до 12 часов, предпочтительно от 1 часа до 8 часов, с получением смеси стадии (pre-iii), которую подвергают стадии (iii) экстракции или первой стадии (iii.a) экстракции.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором указанная гиалуроновая кислота или ее соль, полученные в способе, имеют среднемассовую молекулярную массу от 50 кДа до 350 кДа, предпочтительно от 100 кДа до 300 кДа.

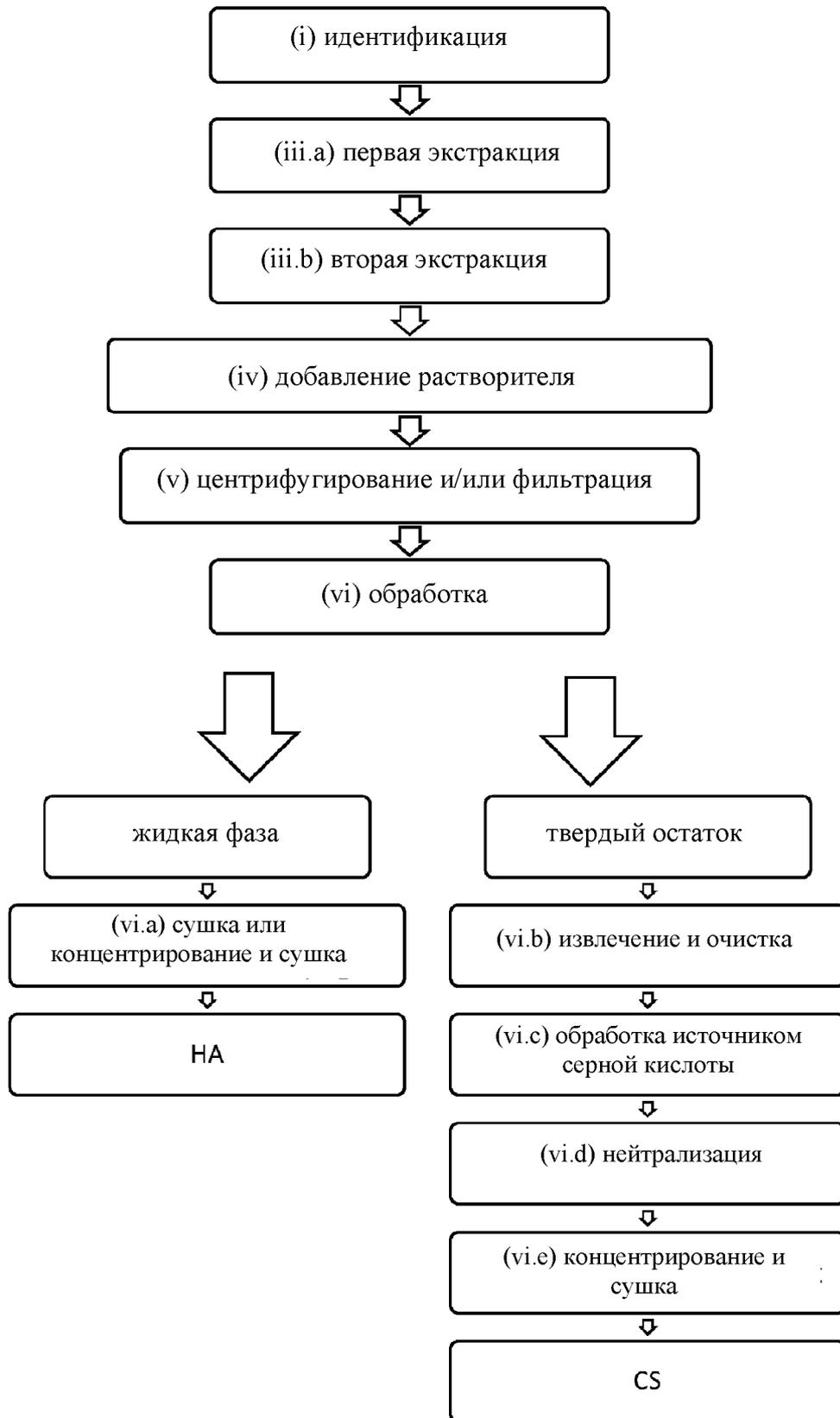
7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором на стадии (iv) растворителем для осаждения является этанол.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором стадия (viii) сушки включает или, альтернативно, состоит из лиофильной сушки.

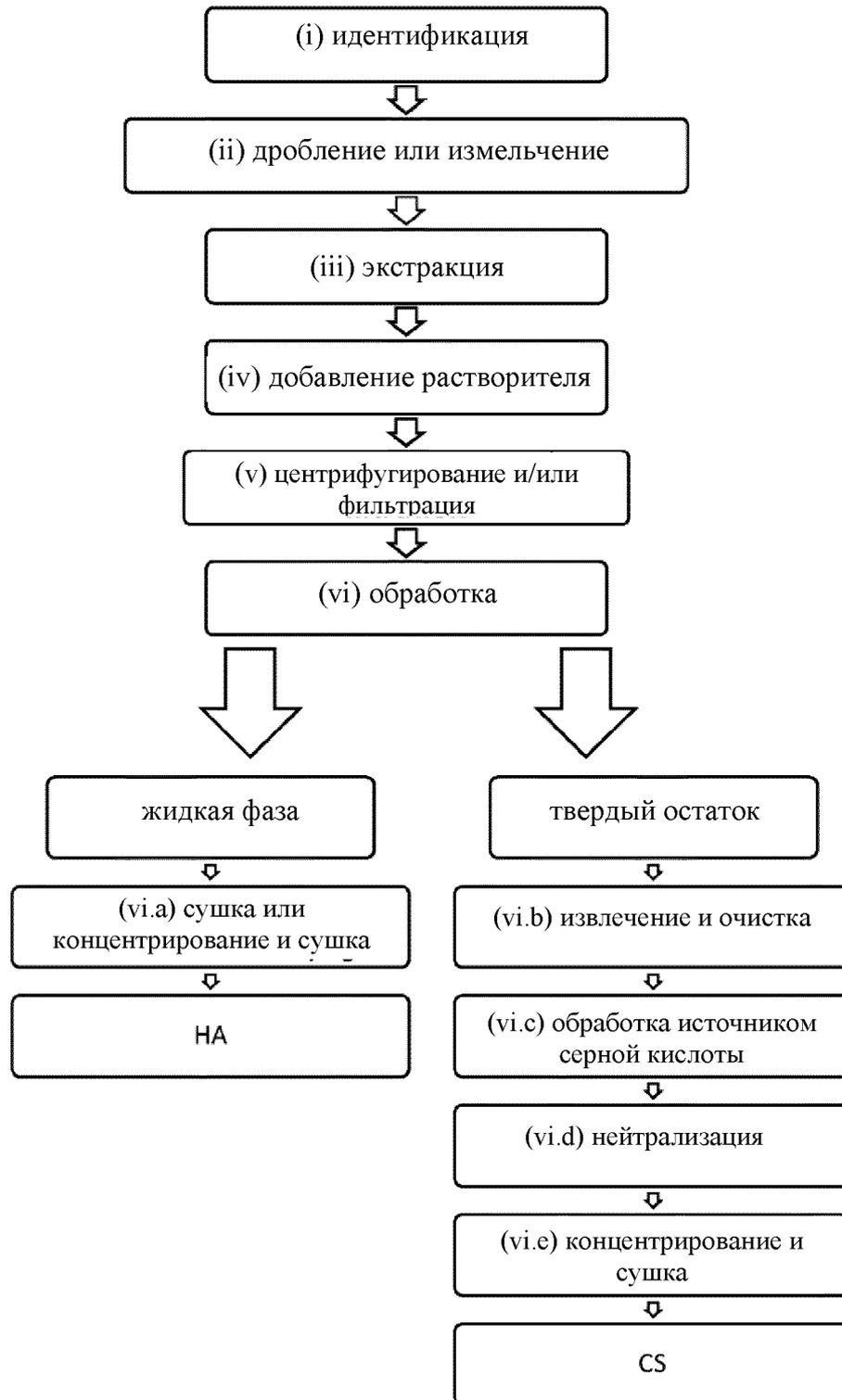


Фиг. 1

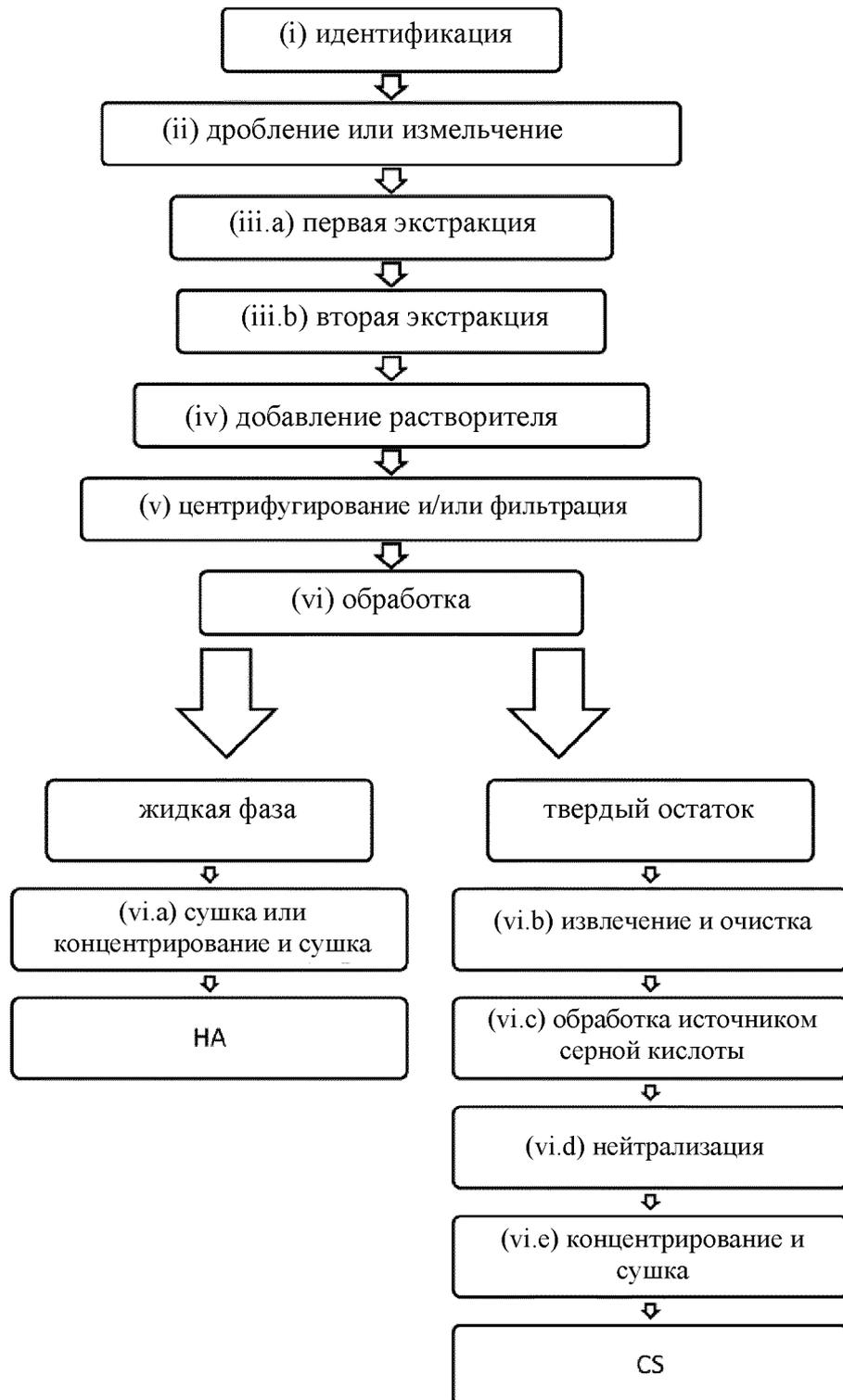
2/10



Фиг. 2

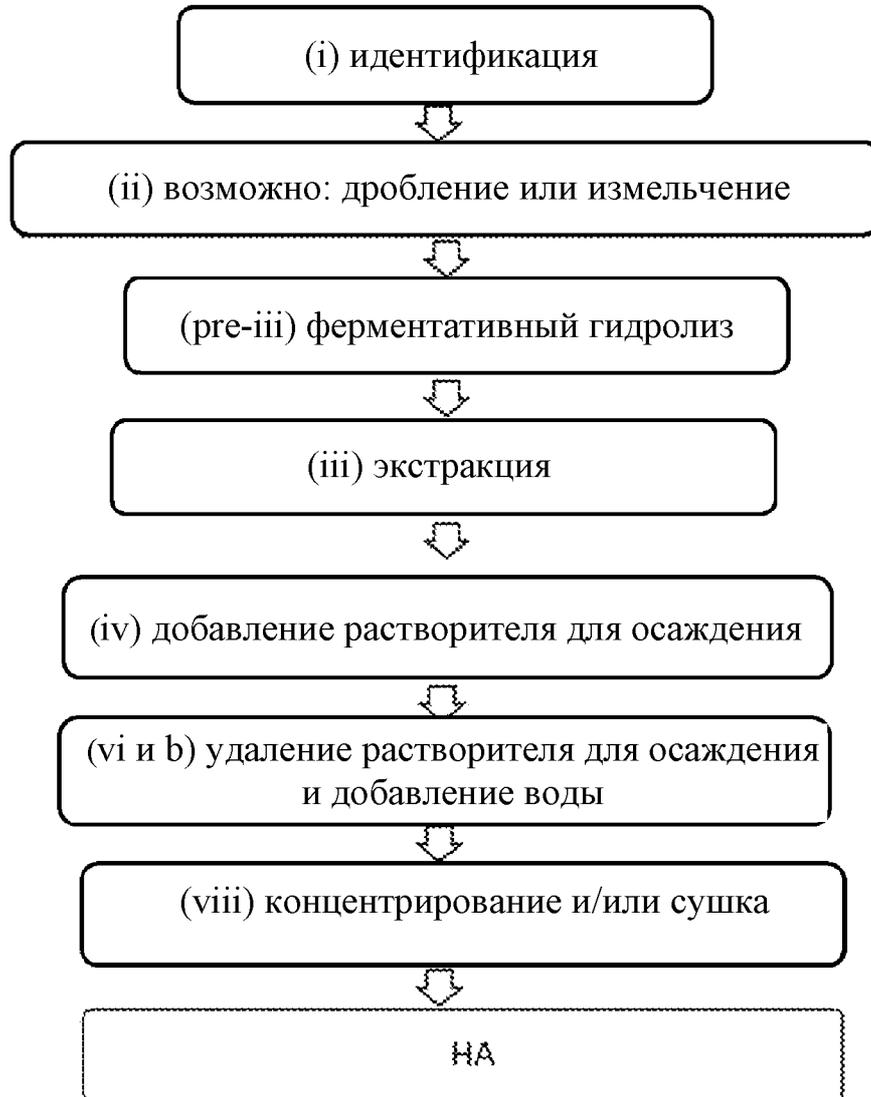


Фиг. 3



Фиг. 4

5/10

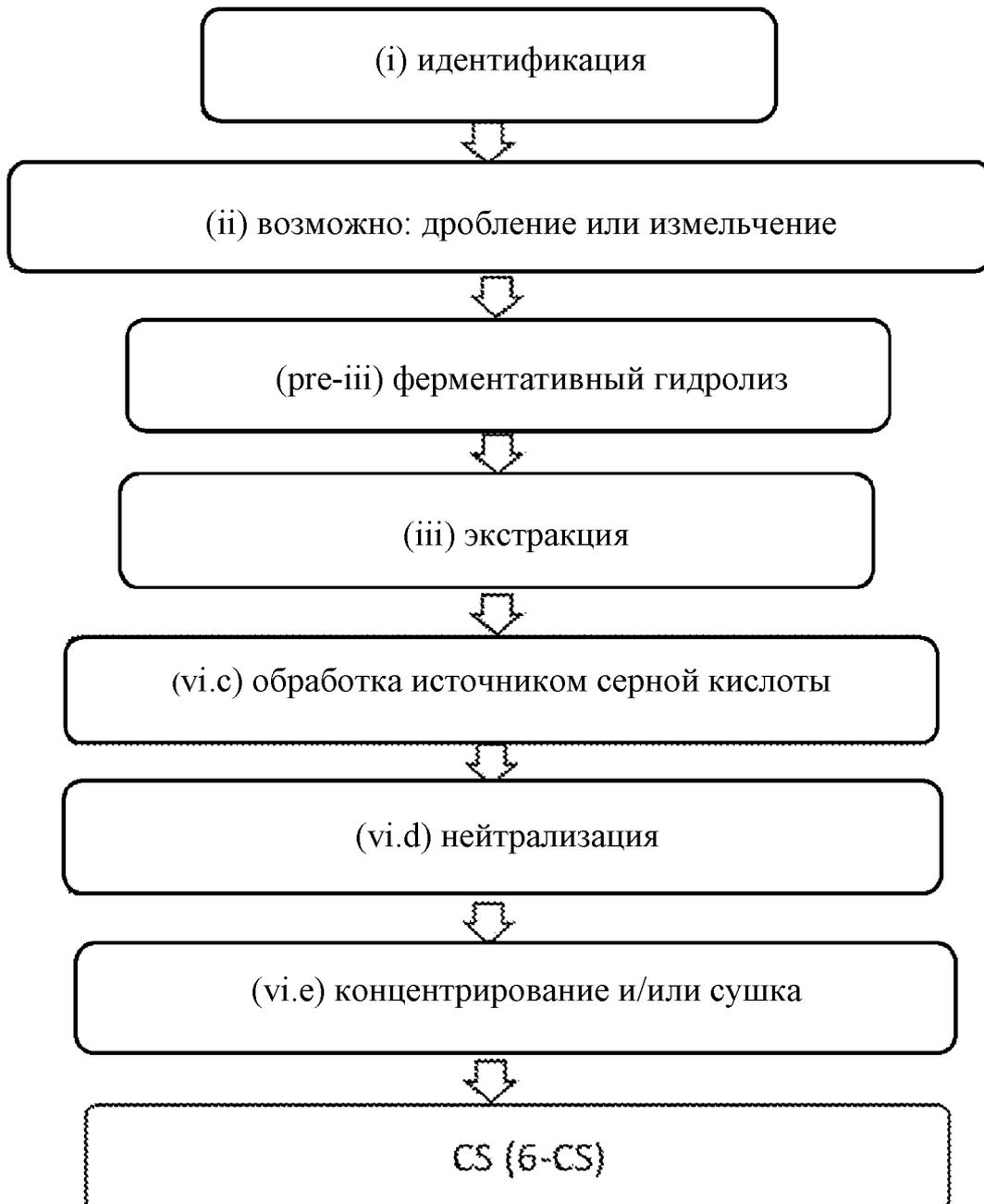


Фиг. 5

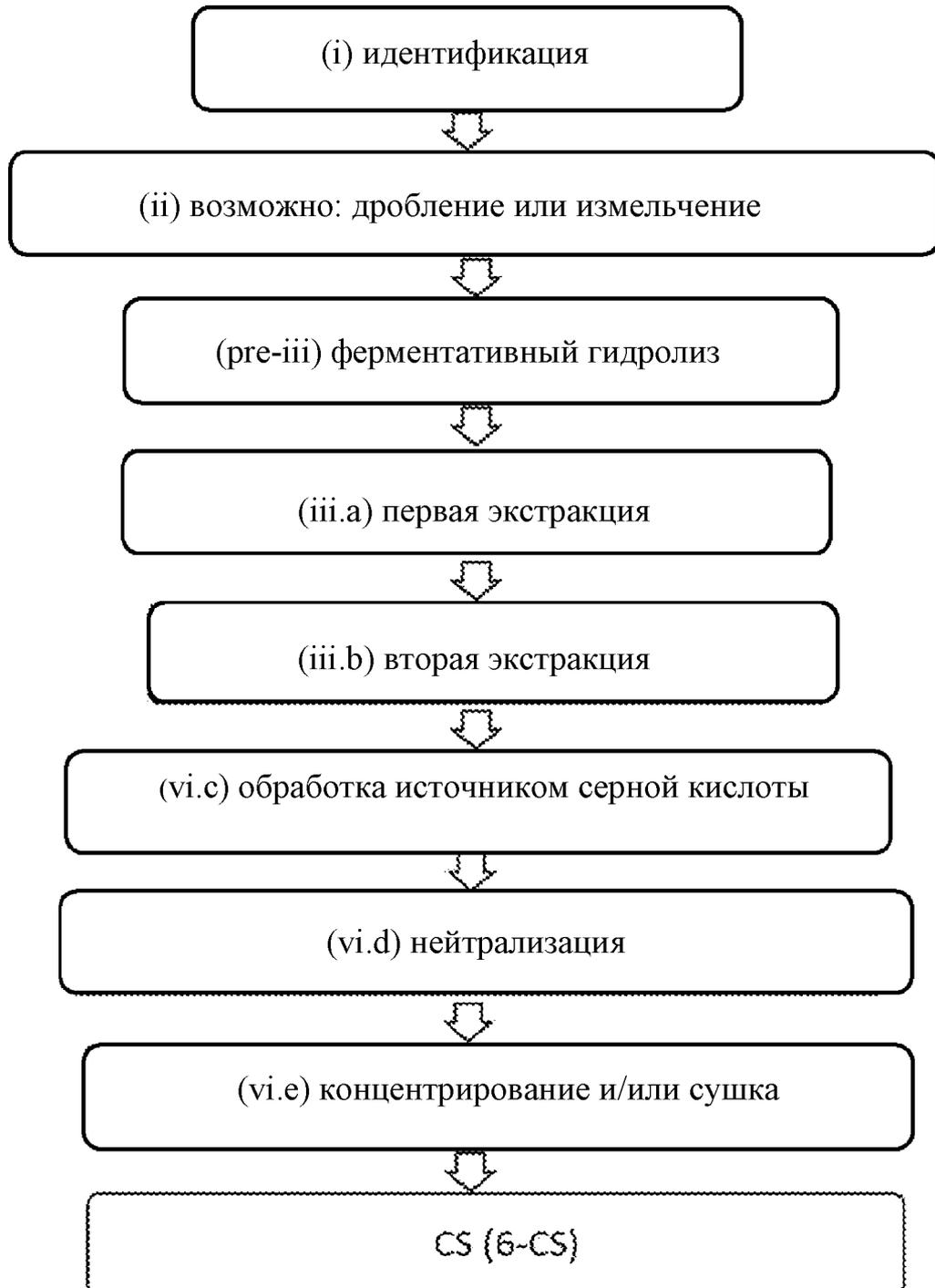
6/10



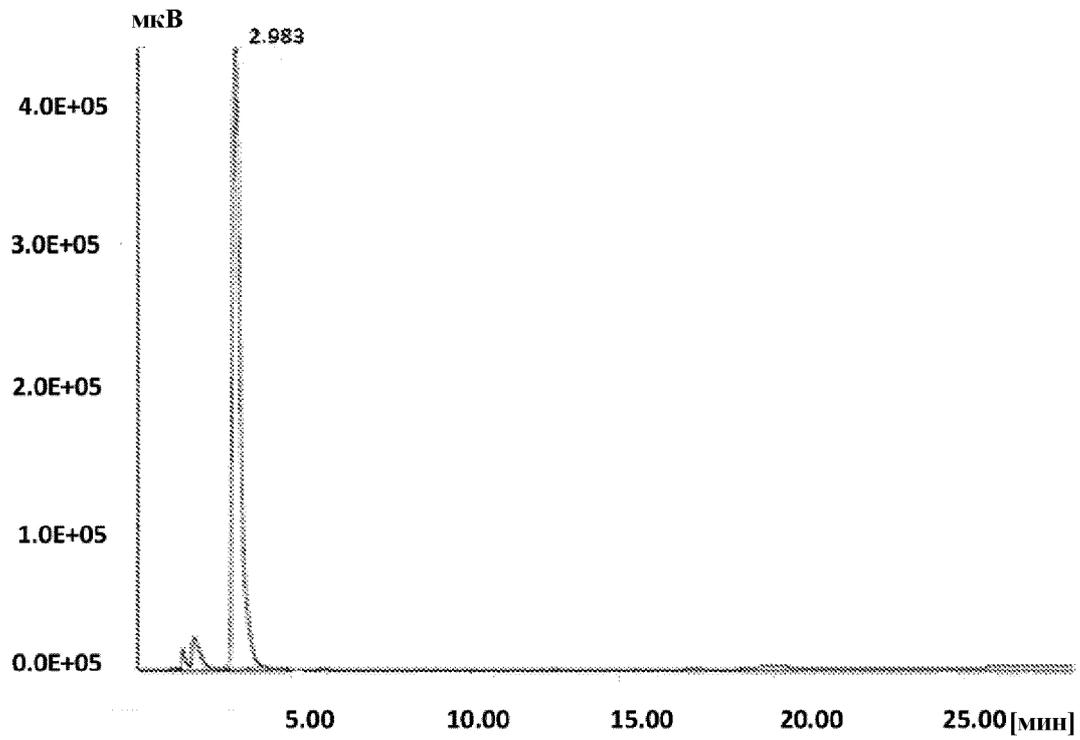
Фиг. 6



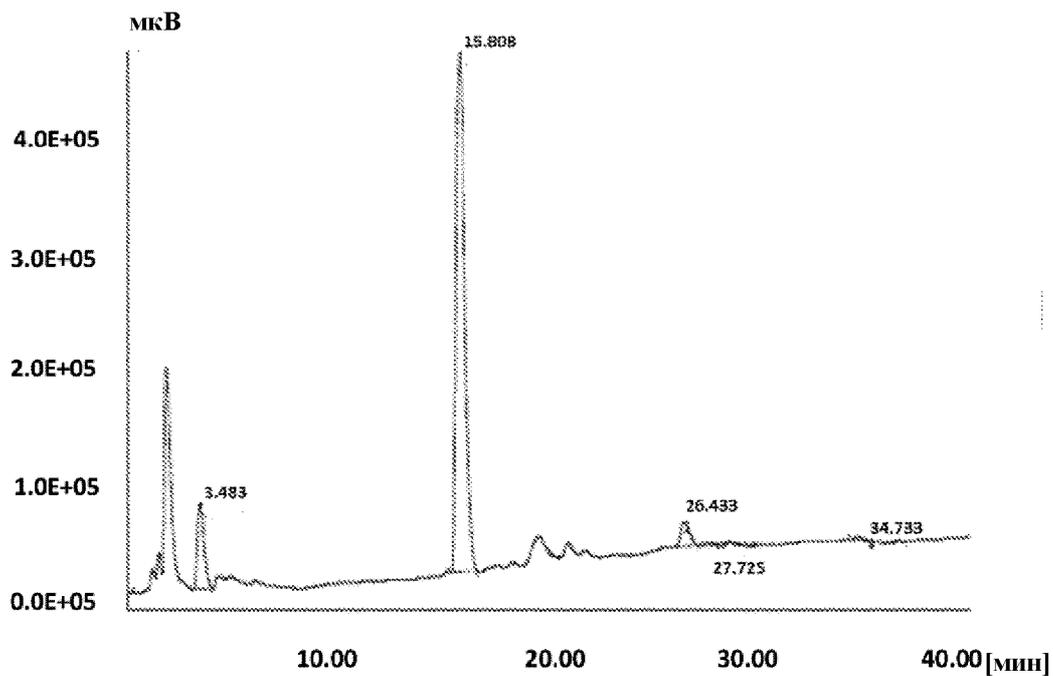
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10