



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 97-01452	(61) Perfecționare la brevet: Nr.
(22) Data de depozit: 30.10.1995	(62) Divizată din cererea: Nr.
(30) Prioritate: 03.02.1995 US 08/384.555;	(86) Cerere internațională PCT: Nr. CA 95/00617 30.10.1995
(41) Data publicării cererii: BOPI nr.	(87) Publicare internațională: Nr. WO 96/23512 08.08.1996
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 30.05.2002 BOPI nr. 5/2002	(56) Documente din stadiul tehnicii: US 4473551
(45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr.	

(71) Solicitant:	LES LABORATOIRES AETERNA INC., QUEBEC, CA;
(73) Titular:	LES LABORATOIRES AETERNA INC., QUEBEC, CA;
(72) Inventatori:	DUPONT ERIC, ST.NICOLAS, QUEBEC, CA; BRAZEAU PAUL, QUEBEC, CA; JUNEAU CHRISTINA, STE-FOY, QUEBEC, CA; MAES DANIEL H., HUNTINGTON, US; MARENUS KENNETH, DIX HILLS, NEW YORK, US;
(74) Mandatar:	ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI;

(54) **COMPOZIȚIE PENTRU TRATAMENTUL UNEI DEGENERĂRI, BOLI
COLAGENICE SAU INFLAMATORII**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o compoziție pentru tratarea unei degenerări, boli colagenice sau inflamatorii. Compoziția conform invenției este constituită din 0,8...1,75% extract de cartilajiu de rechin, 0,01...5% antioxidant, opțional

0,7...10% agent inflamator, precum și un purtător acceptabil farmaceutic, procente fiind exprimate în greutate.

Revendicări: 14
Figuri: 19

RO 117590 B1



Invenția se referă la o compoziție pentru tratamentul unei degenerări, boli colagenice sau inflamatorii, utilizată în tratamentul medical.

Cartilagiul este un țesut nevascularizat și a fost studiat pentru conținutul său de factori antiangiogeni. El este, de asemenea, un țesut relativ rezistent la dezvoltarea tumorilor. Tumoarea asociată cartilagiului, condrosarcomul, este cea mai puțin vascularizată dintre tumorile solide. Angiogeneza este unul dintre factorii importanți în dezvoltarea unei tumori. Masele tumorale solide și discrete apar dacă celulele tumorii pot provoca extinderea rețelei vasculare, adiacente, pentru a le asigura necesitățile nutriționale. Factorii implicați în stimularea angiogenezei au fost studiați pentru rolul lor în dezvoltarea tumorilor, iar factorii antiangiogeni precum și medicamentele cu activitate de inhibare a angiogenezei au fost, de asemenea, investigați ca mijloace de control al creșterii tumorilor sau pentru realizarea regresiei tumorilor.

S-a descoperit că cartilagiul scapular al vițelilor conține o substanță care inhibă vascularizarea tumorilor solide (Langer și colab. 1976). Datorită potențialului său încurajator ca agent antitumoral, s-au căutat surse mai consistente de cartilagiul.

Rechinii sunt animale care reprezintă o sursă potențială de astfel de inhibitor al angiogenezei, întrucât endoscheletul lor este compus, în întregime, din cartilagiul (6% din greutatea lor corporală, față de 0,6% la viței). Totodată, rechinii prezintă, ca o caracteristică interesantă, o predispoziție scăzută către dezvoltarea de tumori. Au fost elaborate multe ipoteze pentru a explica această posibilitate scăzută a rechinilor de a dezvolta tumori. Marchalonis și colab. (1990) au evidențiat anticorpi IgM capabili de a ataca rapid orice agent agresor. McKinney și colab. (1990) au arătat că rechinii au celule macrofage, capabile de a diferenția celulele normale de celulele neoplastice și de a le distruge pe cele din urmă. Rosen și Woodhead (1980) au afirmat că raritatea tumorilor la elasmobranhiate (un grup cărui îi aparțin rechinii și calcanii) s-ar putea datora rezistenței ionice mari din țesuturile lor, ceea ce este echivalent unei temperaturi corporale ridicate. În aceste condiții, acești autori cred că sistemul imunitar exercită o supraveghere imunologică, apropiată de 100%. Moore și colab. (1993) au descoperit că rechinii produc un aminosterol cu proprietăți antibacteriene și anti-protozoare. În fine, Lee și Langer (1983), Folkman și Klagsbrun (1987) au arătat că rechinii produc o substanță care inhibă neovascularizarea. Lee și Langer au izolat această substanță extrăgând-o din cartilagiul de rechin, în condiții de denaturare (extracția cu guanidina). Acest proces de extracție este totuși foarte lung (41 zile), poate genera extracte cu factori denaturați, iar producerea de componente active este departe de a fi excelentă. În timp ce grupul de cercetători au constatat că substanța activă izolată de la vițel are o greutate moleculară de aproximativ 16 kilodaltoni (kd), același grup de cercetători nu au dat o greutate moleculară precisă substanței extrase din rechin. Această substanță este definită doar ca având o greutate moleculară mai mare de 3500 daltoni. Oikawa și colab. (1990) au aplicat aceeași metodă de extracție descrisă de Lee și Langer, dar pe o durată mult mai mică (2 zile în loc de 41 zile).

Substanța antiangiogenă izolată din cartilagiul de rechin de către Oikawa ș. a. se limitează la o moleculă având o greutate moleculară cuprinsă între 1000 și 10000 daltoni. Schinitsky (**US 4473551**) a descris un extras în apa de cartilagiul pisat, de rechin, a cărui fracțiune de peste 100000 daltoni are o activitate antiinflamatorie, singura sau în combinație cu glucozamina. Nici o sugestie referitoare la o componentă a acestui extras, care să aibă o activitate antiangiogenă sau antitumorală, nu este făcută în acest brevet. Kuetner și colab. (**US 4746729**) au izolat un inhibitor de elatază polimorfonuclear-neutrofil (PMN) din cartilagiul de bovine. Acest inhibitor a fost obținut dintr-un extras apos de cartilagiul, din care au fost reținute moleculele cu o greutate moleculară mai mică de 50000 daltoni. Fracționarea pe

Sephacryl S-200 a dus la obținerea de numeroase fracțiuni din care au fost grupate cele cu greutatea moleculară de 10 - 40 kD, după ce au demonstrat o activitate anti-elastază. Componenta activă are un punct izoelectric de 9,5 și poate avea o greutate moleculară de aproximativ 15000 Daltoni. Kuetner și colab. (US 4042457) au arătat și că, cartilagiul bovin are o componentă de greutate moleculară mai mică de 50000 Daltoni, care are o activitate de inhibare a proliferării celulelor, fără a avea vreo activitate asupra creșterii celulelor de endoteliu. Balassa și colab. (US 4822607) au obținut un extract de cartilagiul într-o soluție apoasă, extract care are o activitate antitumorală. Totuși, nu s-a observat vreo activitate anti-angiogenă într-un extract obținut prin reproducerea metodei propuse de Balassa. Spilburg ș.a. (US 4243582) au izolat două glicoproteine cu greutatea moleculară de 65 kD și cu pl 3,8 din cartilagiul bovin (extracție cu guanidină), care prezintă activitate antitripsină și activitate de inhibare a creșterii celulelor de endoteliu.

Cartilagiul de viței și de rechin prezintă multe activități biologice, cum ar fi activitate proinflamatorie, activitate antiinflamatorie, activitate antiangiogenă, activitate lizozimă, activitate de promovare a creșterii de celule, activitate inhibitoare împotriva collagenazei de tip I și de tip IV, a elastazei și a altor proteaze ca tripsina, chimotripsina și plasmida. Totuși, nimeni nu a obținut încă un extract de cartilagiul, care să cuprindă o grupare de activități valoroase din punct de vedere clinic.

Componente antiangiogene de cartilagiul de rechin au fost testate, în general, pe probe de cornee de iepure sau de probe de membrană carioalantoică de pui (CAM). Până în prezent, cartilagiul pisat integral a fost testat direct pe tumori *in vivo*, pe xenogrefa de melanom uman, implantată în șoareci (US 5075112), după cum a fost testat și în teste CAM pentru efectele sale antiangiogene. Chiar dacă extractelor de cartilagiul le-a fost atribuit un efect antitumoral, acest efect a fost, cel mai adesea, atribuit componentei antiangiogene care împiedică alimentarea cu sânge a tumorii. Până în prezent, nu există nici o dovadă că un cartilagiul de rechin are un efect direct asupra proliferării celulelor tumorii.

Se cunosc extracte din cartilagiul de rechin, constituite din 0,10...7,35% lipide, 1,77...46,2% proteine, 33,6...416 mg% sodiu, 39,2...264 mg% potasiu, 0,02...114 mg% calciu, 1,1...149 mg% magneziu, urme de fier și zinc, și cuprind molecule cu o greutate moleculară sub 500 kilodaltoni (KD), un punct izoelectric de 5,30...7,49, prezintă activitate antiangiogenică *in vivo*, o activitate regresivă a dimensiunilor tumorilor *in vivo* și o activitate antitumorală directă *in vivo*, fără a prezenta vreo activitate asupra celulelor normale *in vivo*.

Sunt deja cunoscute câteva procedee de obținere a extractelor și fracțiunilor de cartilagiul de rechin. Unele dintre ele produc un cartilagiul pulverizat fără vreo extracție (US 5075112). Altele utilizează agenți de denaturare ca guanidina (US 4243582). Altele prevăd o pretratare a cartilagiului, prin intermediul unei digestii enzimatice, pentru debarasarea de orice structuri musculare, nervoase sau vasculare, care înconjoară cartilagiul, această etapă de pretratare fiind urmată de eliminarea grăsimilor în solvenți organici, după care componentele active sunt extrase într-o fază apoasă (Balassa și colab. - US 3478146, 4350682, 4656137 și 4822607). Efectul unei asemenea pretratări asupra păstrării integrității componentelor biologice active ale cartilagiului nu este cunoscut. Dacă este prea extinsă, o digestie cu enzime poate hidroliza componentele proteice active. Metoda propusă de Balassa nu include o etapă de fracționare, care ar îmbogăți un extract în componente active. Alte procedee propun producerea de extracte apoase (US 4473551) sau de sare (US 4746729) de cartilagiul, prin eliminarea materialului nesolubilizat. Printre cele din urmă, există unele în cadrul cărora s-a reținut pentru studiere și purificare ulterioare fracțiuni specifice cu greutatea moleculară specifice.

Procedeele prezentate mai sus prezintă câteva dezavantaje. Ele pot denatura anumite componente valoroase. Atunci când nu ar fi vorba de așa ceva, ele pot avea dezavantajul de a dura prea mult, pentru a avea o finalizare practică. În plus, procedeele de lungă durată nu produc, în mod implicit, cantități suficiente de componente active, iar printre componentele recuperate (unele nu sunt recuperate deloc) unele sunt recuperate într-o măsură insuficientă, pentru a prezenta o activitate detectabilă, sau unele componente au fost neglijate prin concentrarea pe obținerea de activități specifice.

Angiogeneza nu este implicată doar în dezvoltarea cancerului. Multe boli sau dereglări ale diferitelor sisteme fiziologice (indicate în paranteze) sunt dependente de angiogeneza, cum ar fi artrita sau plăcite aterosclerotice (oase și ligamente), retinopatia diabetică, glaucomul neovascular, trahomul și neovascularizarea de implant corneal (ochi), psoriazis, scleroderma, hemangiomul și scarificarea hipertrofica (piele), adeziuni vasculare și angiofibrom (sistem circulator). Prin urmare, orice "factor" antiangiogen nou și puternic ar putea găsi o utilizare în tratamentul acestor boli precum și în terapia cancerului. În plus, întrucât multe dintre bolile și disfuncționalitățile menționate mai sus au și o componentă inflamatorie, orice "factor" antiinflamator nou și puternic ar putea găsi o utilizare în tratamentul acestor boli și disfuncționalități precum și al oricăror altor boli sau disfuncționalități inflamatorii. Pe deasupra, întrucât proteazele, cum ar fi collagenazele, sunt implicate într-o diversitate de boli și disfuncționalități, cum ar fi cancerul și îmbătrânirea prematură, datorită activității de degradare a collagenului, un "factor" anticolagenolitic nou și puternic ar putea găsi o utilizare în tratamentul bolilor și disfuncționalităților, având o componentă colagenolitică. Întrucât angiogeneza, inflamațiile și proteazele, cum ar fi collagenazele, pot fi întâlnite, singure sau în combinație, într-o mare varietate de boli sau de disfuncționalități, un produs care ar fi capabil de a combate cel puțin aceste activități, fără a afecta funcțiile normale ale corpului, ar fi de o mare valoare terapeutică.

Invenția se referă la o compoziție pentru tratarea unei degenerări, boli colagenice sau inflamatorii, care este constituită din 0,8...1,75% extract de cartilagiu de rechin, 0,01%...5% antioxidant, cu sau fără 0,7%...10% agent inflamator precum și un purtător acceptabil farmaceutic, procente fiind exprimate în greutate.

Invenția prezintă și avantajul că se obține o compoziție pe bază de compuși naturali cu o mare biodisponibilitate.

Extractul este o fracțiune a supernatantului obținut după centrifugarea unui amestec omogen apos de cartilagiu integral de rechin, supernatantul fiind fracționat printr-o membrană cu o valoare moleculară a fracției de masă de 500 Kda, extract care conține 0,10...0,20% lipide, 8...25 mg/ml proteine, 97...99% umiditate, 30...220 mg% sodiu, 30...40 mg% potasiu, 2 mg% calciu, 1,1 mg% magneziu, urme de zinc și fier, și are acțiuni anticolagenolitice și antiinflamatoare.

Dereglarea sau boala pe care o tratează compoziția este selectată dintre arterită, iritații ale pielii, inflamații ale pielii. Inflamația pielii este cauzată de abraziune fizică, de un iritant chimic, de expunerea la radiația ultravioletă. Compoziția poate fi o compoziție enterică și o compoziție topică.

Avantajul invenției este acela că, datorită asocierii componentelor, rezultă o compoziție cu efecte anticolagenolitic, antiinflamator cu biodisponibilitate biologică superioară.

În descrierea invenției, se arată cum se obțin extractele de cartilagiu, care au avantajul de a conține o multitudine de activități valoroase din punct de vedere terapeutic. Printre acestea, activitățile antiangiogene, antiinflamatorii, anticolagenolitice, antiproliferare a tumorilor *in vivo* și antiproliferare a tumorilor direct *in vitro* au fost confirmate ca prezente în concentrații satisfăcătoare într-un extract de cartilagiu de rechin. Alte activități își așteaptă identificarea sau confirmarea. Efectul măsurat în liniile de celule tumorale a indicat faptul că, pe

lângă activități directe antiproliferare a tumorilor, apare și o activitate citotoxică. Toate activitățile au fost obținute într-un extract lichid de cartilagiu de rechin, iar unele dintre ele au fost obținute sau verificate într-un extract solid de cartilagiu de rechin. 145

Extractul de rechin care se utilizează la obținerea unei compoziții farmaceutice cuprinde următoarele etape:

a) omogenizarea cartilagiului într-o soluție apoasă în condiții compatibile cu păstrarea integrității componentelor biologic active menționate, până când cartilagiul este redus la particule a căror mărime este mai mică sau egală cu aproximativ 500 μm , rezultând un amestec de particule și de extract lichid brut, având componentele biologic active menționate; 150

b) centrifugarea soluției omogenizate menționate pentru a separa particulele din extractul lichid brut; 155

c) separarea ulterioară a extractului lichid brut, astfel încât să se obțină un extract lichid final conținând molecule de cartilagiu, care au o greutate moleculară mai mică decât sau egală cu aproximativ 500 kilodaltoni.

Acest procedeu are avantajul de a fi ușor de realizat și eficient. S-au obținut randamente mari de producere a extractului de cartilagiu, extract care, obținut, în special, din cartilagiu de rechin, conține cel puțin toate activitățile biologice menționate mai sus. Procedeu se desfășoară, de preferință, la temperatură scăzută (aproximativ 0 - 10°C), în condiții nedeurante (de preferință, în apă pură), la un pH aproape neutru (aproximativ 6 - 8) pentru a maximaliza probabilitatea de a recupera compuși cu caracteristici fizico-chimice necunoscute. Conform acestui procedeu, componentele cartilagiului pot fi extrase într-un volum mic de soluție (la nivelul de 1 l pentru 1 kg de cartilagiu) și după o perioadă scurtă de omogenizare (la nivelul a 10 - 15 min). Pentru recuperarea unui extract solid este folosit același procedeu, cu excepția faptului că este recuperat și liofilizat peletul, neglijându-se supranatantul. 160

În invenție, se folosesc extracte de cartilagiu, în particular un extract provenind de la specii elasmobranhiate, îndeosebi de la rechini. Extractul solid a dovedit activitate. El poate conține collagen și componente ne-hidrosolubile. El poate conține de asemenea o activitate reziduală a ceea ce a fost extras în extractul lichid total. Extractul lichid total este foarte bogat în activitate. El poate fi utilizat ca atare sau poate fi concentrat. A fost preferată o etapă de concentrare care favorizează menținerea activităților biologice. Din precauție, a fost evitat recursul la procedee care ar putea deteriora componentele active, cum ar fi evaporarea la caldura. A fost utilizată ultrafiltrarea pe o membrană cu o valoare de separare a greutății moleculare de aproximativ 1 kDa, pentru a concentra extractul lichid. Drept rezultat, a fost obținut și testat un extract concentrat, conținând molecule cu greutatea moleculară cuprinsă între aproximativ 1 kDa și aproximativ 500 kDa. Extractul lichid total (de la 0 la 500 kDa) a fost ulterior fracționat pentru a caracteriza componentele sale active. Numeroase fracțiuni au fost obținute prin diferite procedee. Unele dintre ele, testate pe linii de celule tumorale, au fost caracterizate, în mare, prin greutatea moleculară și punctul izoelectric. Alora li s-a atribuit o activitate, în particular, activități anticlagenolitice sau antiangiogene. Aceste fracțiuni își așteaptă caracterizarea și identificarea completă. Prin urmare, într-un extract lichid total și în fracțiuni ale acestuia se recuperează activități valoroase care pot fi utilizate în mod avantajos. 165

În loc de a administra cantități mari de cartilagiu pisat, acum poate fi administrat un extract mai acceptabil și îmbogățit. 170

Invenția descrie o compoziție terapeutică sau cosmetică, cuprinzând, ca ingredient activ, unul dintre extractele de cartilagiu de mai sus. Un mare interes a fost îndreptat către compozițiile utilizate în dermatologie și cosmetica. Acest interes provine din activitățile observate pentru extractele de cartilagiu. În această privință, activitățile anticlagenolitice și 185

antiinflamatorii observate, precum și efectul antagonic al diferențierii celulare mediat de către inducerea de protein-kinaza C în cheratinocite, au fost considerate ca deschideri de drum, către utilizarea extractelor de cartilagiu de rechin în compoziții și metode pentru reducerea inflamațiilor, regularizarea ridurilor sau a atrofiei pielii, încetinirea îmbătrânirii premature, reducerea acneei, îmbunătățirea funcției de barieră a pielii, reducerea inflamației sau iritației și pentru un efect de calmare a pielii. Invenția acoperă și astfel de metode. În plus, întrucât extractul lichid de cartilagiu de rechin a fost testat, cu succes, în tratamentul cancerului, artritei, psoriazisului și al cazurilor de acnee, invenția acoperă și compoziții și descrie metode pentru tratarea bolilor sau disfuncționalităților având una sau mai multe componente selectate din grupul constând în proliferarea tumorilor, angiogeneza, inflamare și colagenoliză.

Se dau, mai jos, fig. 1...19 în legătură cu exemplul de realizare al invenției:

- fig.1, ilustrarea activității inhibitorii a unor doze crescătoare de cartilagiu de rechin (extract solid), asupra unor celule ZR75-1 și MCF-7;

- fig.2, ilustrarea curbelor de reacție la doză a cantității de celule MCF-7, măsurată prin conținutul lor de ADN în prezența unor concentrații crescânde de estradiol, cu sau fără două concentrații de liofilizat de cartilagiu;

- fig.3A și 3B, comparația între secțiuni de ficat de șobolani prezentând cancer al glandei mamare, unora administrându-li-se o combinație de liofilizat de cartilagiu și supernatant, iar celorlalți administrându-li-se doar apă;

- fig.4A și 4B, comparația între secțiuni de rinichi de șobolani prezentând cancer al glandei mamare, unora administrându-li-se o combinație de liofilizat de cartilagiu și supernatant, iar celorlalți administrându-li-se doar apă;

- fig.5A și 5B, comparația între secțiuni de plămân de șobolani, prezentând cancer al glandei mamare, unora administrându-li-se o combinație de liofilizat de cartilagiu și supernatant, iar celorlalți administrându-li-se doar apă;

- fig.6A și 6B, comparația între secțiuni de tumoare a glandei mamare, aparținând unor șobolani care prezintă o astfel de tumoare, unora administrându-li-se o concentrație de liofilizat de cartilagiu și supernatant, iar celorlalți administrându-li-se doar apă;

- fig.7, histogramă derivată din fig. 6A și 6B, ilustrând efectul extractului de cartilagiu asupra ariei vaselor de sânge din tumori;

- fig.8, profilul electroforetic în condiții ne-denaturante al fracțiunilor lichide separate pe Rotofor; în partea stângă apar markeri de greutate moleculară, urmați de un eșantion al permeatului brut înainte de fracționare, în vederea comparării cu fracțiunile izolate;

- fig.9A și 9B, ilustrarea îmbunătățirii semnificative a stării a doi pacienți suferind de psoriazis, unul cu hipercheratoza (9A). iar celălalt fără hipercheratoza (9B), la tratarea cu o compoziție conținând o cantitate eficientă de extract lichid, concentrat de cartilagiu (fotografiile de jos) în comparație cu starea lor inițială (fotografiile de sus);

- fig.10, caracteristica de migrare FPLC a trei extracte diferite de cartilagiu de rechin; în fig. 10A, DUP reprezintă cazul unui extract lichid de cartilagiu conform invenției, în timp ce în fig. 10B și 10C, BAL și OIK reprezintă cazurile extraselor cunoscute, propuse de către Balassa ș.a. și respectiv Oikawa ș.a.;

- fig.11, caracteristica de migrare HPLC a aceluiași trei extrase definite în fig. 10;

- fig.12, rezultatele testelor CAM realizate cu utilizarea unor concentrații diferite de protamina, un compus de referință antiangiogen, comparat cu elementul de control;

- fig.13, rezultatele testelor CAM realizate cu două fracțiuni din extractul lichid total de cartilagiu de rechin conform invenției (DUP), un având greutatea moleculară mai mică decât 10000 Daltoni, iar cealaltă având greutatea moleculară mai mare decât 10000 Daltoni;

- fig.14, rezultatele testelor CAM realizate cu extractul lichid total conform invenției (DUP), comparate cu rezultatele obținute pentru o concentrație echivalentă de produs realizat prin procedeul propus de Balassa (BAL);

- fig. 15, rezultatele testelor CAM realizate cu extractul lichid total conform invenției (DUP), comparate cu rezultatele obținute pentru un eșantion provenind dintr-o cantitate egală în greutate de materie uscată dintr-un produs realizat prin procedeul propus de Oikawa (OIK); 245

- fig. 16, ilustrarea efectelor obținute cu TPA asupra cheratinocitelor în comparație cu efectele obținute cu DMSO ca element de control, ambele măsurate în prezența sau absența unui extract lichid total de cartilagi de rechin preparat conform invenției; 250

- fig. 17, ilustrarea efectelor antiinflamatorii ale extractului lichid total conform invenției asupra unui model de iritare a pielii;

- fig. 18, altă caracteristică de migrare HPLC a unei fracțiuni a extractului lichid total conform invenției, având greutatea moleculară mai mică decât 10000 Daltoni, fracțiunea fiind concentrată și separată în cinci sub-frațiuni; 255

- fig. 19, ilustrarea efectului anticolagenolitic al fiecărei sub-frațiuni prezentate în figura 18 la diferite volume testate.

Cartilagiul se obține de la rechini sănătoși din rasa rechinului țepos negru și a rechinului țepos comun. Toate țesuturile musculare și de legătură se îndepărtează prin răzuire cu scalpele și foarfeci, tratate cu etanol. Cartilagiul este apoi împachetat, sub vid, în pungi de plastic și înghețat la - 20°C, în vederea utilizării ulterioare. În acest procedeu pot fi utilizate orice surse de cartilagi. Am ales cartilagiul de rechin pentru motivele enunțate în capitolul de prezentare a stadiului tehnicii. Se consideră că s-ar obține produse aproximativ echivalente plecând de la cartilagi de elasmobranhiate (care includ rechinii și calcanii ca specii animale ale acestui grup). Produsele ar fi probabil diferite, dacă s-ar utiliza mamifere ca sursă pentru cartilagi. 260 265

Poate fi utilizată orice variantă de preparare a cartilagiului înainte de extracție, atât timp cât astfel nu se afectează substanțial activitatea produsului de interes (de exemplu, un extract lichid total sau o anumită fracțiune a acestuia). Anumite componente active pot rezista digestiei proteolitice (conform celor expuse de Balassa și colab. **US 4822607**), în vederea debarasării cartilagiului de orice țesut înconjurător, în timp ce altele nu pot rezista unui astfel de tratament. Una dintre activitățile care par să nu reziste unei astfel de pre-tratări este activitatea antiangiogenă (fig. 15). Prin urmare, dacă cineva dorește să producă un extract lichid conținând cât mai mult posibil din toate componentele active hidrosolubile cărora le sunt atribuite activități separate, o astfel de etapă de digestie ar trebui evitată sau monitorizată cu atenție pentru a împiedica hidroliza sau proteoliza extensivă. 270 275

Cartilagiul curat este utilizat, proaspăt sau decongelat la 4°C. Cartilagiul se trece apoi de mai multe ori (cu precădere de trei ori), prin orificiile unui tocător de carne, tratat cu etanol, împreună cu un volum corespunzător de apă (o cantitate egală în greutate/volum reprezintă aproximativ volumul minim, dar poate fi mărită, fără vreun efect asupra randamentului de recuperare a componentelor valoroase). Din punct de vedere practic, un volum mic este preferat, întrucât este mai comod de manipulat, decât un volum inutil de mare. În practică, apa este purificată prin osmoză inversă și filtrare, printr-un filtru de 0,1 μm. În locul apei, pot fi utilizate multe alte soluții apoase (conținând, de exemplu, săruri). Atunci când se urmărește recuperarea mai multor activități hidrosolubile, se preferă lucrul la un pH aproape neutru și în condiții nedeurante, pentru a evita liza sau denaturarea unora dintre componentele cartilagiului. Comportarea proteinelor necunoscute, în solvenți apoși, nu este previzibilă; unele "se pot simți mai bine" la un pH acid, altele la un pH bazic. În plus, unele proteine pot fi extractibile, în condiții ușor denurante, dacă o astfel de denaturare nu afectează ireversibil renaturarea acelor proteine în soluții apoase. Prin urmare, luând în considerare toți acești factori, realizarea procedurii de extracție a componentelor active ale cartilagiului, în apa pură, s-a dovedit a fi o alegere judicioasă pentru recuperarea cu un foarte bun randament al componentelor cu o structură și comportare necunoscute. 280 285 290

Amestecul cartilagiu/apă este apoi omogenizat, prin agitare la viteza maximă, într-un agitator de bucătărie, la aproximativ 4°C, timp de 10 min. Desigur, viteza de agitare și volumul soluției apoase pot influența timpul de extracție. Prin urmare, o gamă rezonabilă a timpului de omogenizare ar avea drept limită inferioară, 10 min și drept limită superioară, 24 h, de preferință fiind cuprinsă între aproximativ 10 și 60 min. Temperatura trebuie menținută sub aproximativ 10°C, pentru a evita orice degradare a componentelor active, de către enzime endogene, atunci când nu sunt utilizați inhibitori de enzime. În mod ideal, trebuie căutată o temperatură aproape de 0°C. Întrucât, în mod normal, o astfel de experimentare se desfășoară într-o încăpere rece în care temperatura poate fi menținută între 4 și 10°C, acest domeniu de temperaturi este acceptabil pentru acest procedeu. În scopul clarității și exprimării laconice, expresia "aproximativ 4°C" va fi utilizată în cele de mai jos pentru a desemna acest domeniu acceptabil de temperatură.

Dacă agitatorul nu a redus suficient mărimea particulelor, se poate obține, în continuare, o lichefiere a acestui amestec omogenizat, prin supunerea sa unui dezintegrator Polyttron pentru un timp de 10 min, la o temperatură de 4°C. În altă variantă, amestecul poate fi omogenizat într-un agitator-dezintegrator mai performant, cu ajutorul căruia se poate evita etapa de 10 min de lichefiere. La capătul etapei de omogenizare completă, mărimea particulelor rămase este sub aproximativ 500 μm . Desigur, și în acest caz sunt aplicabile aceleași domenii acceptabile de timp și de temperatură expuse la obținerea primului cartilagiu măcinat. Mărimea particulelor după omogenizare, nu trebuie neapărat să fie foarte mică. Prin urmare, poate fi omisă pulverizarea cartilagiului înaintea extracției. Desigur, pulverizarea cartilagiului sub forma unei pulberi, înaintea extracției apoase poate denatura activități valoroase atunci când această pulverizare este realizată în stare uscată, la temperaturi de îngheț sau la temperaturi foarte mari.

Amestecul omogenizat este centrifugat la 13600 g, timp de 15 min, la 4°C, etapa care reprezintă un mod de separare rapidă și eficientă a unui supranatant de un pelet. Varierea și ajustarea acestor parametri este la îndemâna specialistului în domeniu, depinzând doar de volumul amestecului omogenizat și de echipamentul utilizat.

Peletul rezultat este liofilizat timp de 24 - 48 h. Această primă fracțiune este definită, în continuare, drept fracțiunea liofilizată sau un extras solid.

Supranatantul poate fi filtrat cu ajutorul unui filtru Whatman de 24 μm , dacă este necesar, pentru debarasarea de particulele susceptibile de a afecta performanțele unei coloane de ultrafiltrare. Materialul filtrat este apoi ultrafiltrat la aproximativ 4°C într-o coloană de filtrare cu debit tangențial, având o porozitate de aproximativ 500000 Daltoni, care permite obținerea unei fracțiuni filtrate brut, cuprinzând molecule hidrosolubile cu greutatea moleculară cuprinsă între 0 și aproximativ 500 kDa. Acest extract filtrat brut este filtrat steril cu ajutorul unui filtru de 0,22 μm și depus în sticle sterile pentru o utilizare ulterioară. Această fracțiune este menționată, în continuare, drept fracțiunea filtrată brut sau extractul lichid total.

Într-o altă variantă, peletul și supranatantul sunt obținute printr-un proces de centrifugare mai performant. Etapa de centrifugare la 13600 g pentru 15 min, urmată de o filtrare brută cu filtre Whatman este înlocuită cu o centrifugare într-o centrifugă CEPA echipată cu un sac din nylon cu o porozitate de 30 μm , la 3000 - 4000 g. Un preparat de 25 kg/25 l poate fi centrifugat astfel, timp de 30 min, furnizând 29 l de supranatant. Volumul apos, obținut, este mai mare decât volumul de apă inițial, ceea ce sugerează faptul că a fost recoltată o parte din conținutul de apă al cartilagiului însuși. Fracțiunea liofilizată și extrasul lichid total pot avea următoarele compoziții aproximative, care iau în considerare, în mare, variațiile observate de la un lot la altul și pe cele datorate utilizării de material diferit:

Fracțiunea liofilizată:		
lipide:	7,35% ¹	
proteine:	46,2%	345
umiditate:	20,4%	
sodiu:	4,16 mg/g ³	
potasiu:	2,64 mg/g	
calciu:	114 mg/g	
magneziu:	1,49 mg/g	350
urme de zinc și de fier		
Extrasul lichid total		
lipide:	0,10 - 0,20% ¹	
proteine:	8 - 25 mg/ml ²	
umiditate:	97 - 99%	355
sodiu:	30 - 220 mg/100 g ³	
potasiu:	30 - 40 mg/100 g	
calciu:	2,0 mg/100 g	
magneziu:	1,1 mg/100 g	
urme de zinc și de fier		
		360

^{1,2} = măsurate conform directivelor publicate în AQAC Oficial
(1984), secțiunile 16219-220 și respectiv 2055;

³ = măsurat conform procedurii SAA.

Conținutul de proteine este evaluat prin metoda Kjeldahl, care măsoară azotul organic (N). Azotul organic este transformat în proteinele echivalente, cu ajutorul următoarei ecuații:

$$\text{conținutul proteic (mg/ml)} = (\% \text{ N} \times 6,25)/100.$$

Întrucât hidrații de carbon nu sunt detectabili, se poate presupune că ei se află într-unul sau în celălalt extras, dar sub formă de proteoglicani și/sau mucopolizaharide. Este posibil ca acești compuși să fie incluși în nivelul de umiditate, măsurat. Fracțiunea liofilizată conține un nivel neașteptat de umiditate, care a fost măsurat prin intermediul grupelor OH. Întrucât conținutul de 20% apă este apropiat de procentajul de hidrați de carbon regăsit, în mod normal în cartilajiu, iar umiditatea unei fracțiuni liofilizate ar trebui să fie apropiată de 0%, această ipoteză rămâne de verificat.

Sterilitatea a fost controlată cu aplicarea prevederilor USP XXIII, de către:

1/ Laboratoire de génie sanitaire du Québec Inc.

1090, l'Escarbot, Centre Industriel St-Malo, Québec G1N 4J4; și

2/ Northview Laboratories Inc.

1880, Holste Road, Northbrook, IL, 60062 U.S.A. nr.

înregistrare FDA: 14-18028.

Teste de activitate

Fracțiunea liofilizată:

Teste *in vitro*:

Aceste teste au fost efectuate pe liniile de celule canceroase hormono-dependente MCF-7 și ZR75-1 (numere ATCC (R): 22-HTB și respectiv 1500-CRL).

Celule ZR75-1:

Mediu bazal RPMI

52 g RPMI 1640 fără roșu fenol (Sigma R8755), 17,875 g Hepes (acid liber: Sigma HO763), 0,55 g piruvat de sodiu (Sigma P5280) și 10 g NaHCO₃ au fost amestecate în 5 l de apă pură și aduse la pH 7,40 cu NaOH.

Dacă nu este utilizată imediat, această soluție trebuie protejată de lumină, pentru a păstra substanțele fotolabile. Această soluție a fost filtrată, distribuită în sticle sterile de 500 ml și stocate, la 4°C, pentru o perioadă maximă de trei luni.

Mediu de menținere a culturii de celule:

Mediului bazal RPMI i s-a adăugat 10% (v/v) FBS (ser bovin fetal), 100 U penicilina G/50 μ g sulfat de streptomicină (Sigma PO906)/ml de mediu, 2 mM L-Glutamina (Sigma G1517) și 1 nM E₂ (β -estradiol Sigma E8875).

Mediu experimental:

Mediului bazal RPMI i s-a adăugat 5% FBSA (ser bovin fetal adsorbit pe dextran-mangal), 2 mM L-Glutamina, 100 U penicilina G/ 50 μ g sulfat de streptomicină/ml de mediu și 50 ng/ml insulina (Sigma). Acestui mediu i s-au adăugat concentrații crescânde din fracțiunea liofilizată menționată mai sus, precum și diferite concentrații de estradiol (10^{-12} până la - 5 M).

Celule MCF-7:

Mediu bazal DME-F12:

Mediul DME-F12 (fără bicarbonat și fără roșu fenol; Sigma) a fost reconstituit conform instrucțiunilor furnizorului, în apă pură. Pentru un litru s-au adăugat 1,2 g de bicarbonat de sodiu, iar pH-ul a fost făcut 7,40 cu NaOH/HCl. Această soluție a fost filtrată, distribuită în sticle sterile de 500 ml și stocată, la 4°C, pentru o perioadă maximă de trei luni.

Mediu de menținere a culturii de celule:

Mediului bazal DME F12 i s-a adăugat 10% (v/v) FBS (ser bovin fetal), 100 U penicilina G/50 μ g sulfat de streptomicină/ml de mediu, 2 mM L-Glutamina (Sigma) și 1 nM E₂ (estradiol).

Mediu experimental:

Mediului bazal DME-F12 i s-a adăugat 5% FBSA (ser bovin fetal, adsorbit pe dextran-mangal), 2 mM L-Glutamină, 100 U penicilină G/50 μ g sulfat de streptomicină/ml de mediu și 50 ng/ml insulină (Sigma). Așa după cum s-a descris pentru celulele ZR75-1, fracțiunea liofilizată și estradiolul au fost adăugate în aceleași concentrații.

Prepararea FBSA:

Serul bovin fetal a fost amestecat cu 1% (w/v) mangal (carbon decolorant alcalin). O soluție de dextran T70 a fost adăugată la soluția mangal-ser, pentru a se obține o concentrație de 0,1% (w/v). Amestecul a fost agitat peste noapte, la 4°C. După centrifugare, la 4°C, și timp 30 min, a 10000 g, serul a fost decantat, amestecat din nou, cu aceleași proporții de mangal și dextran, agitat la temperatura camerei, pentru 3 h și recentrifugat. Serul a fost apoi inactivat termic, la 56°C, pentru 20 min, filtrat steril și depus în tuburi conice Falcon, sterile.

Celulele ZR75-1 și MCF-7 au fost crescute până la o densitate de populație de 20000 celule/sușă, pe plăci de 24 sușe sau de 150000 celule/sușă, pe plăci de 6 sușe, și tratate în prezența sau absența unor diferite concentrații de fracțiune liofilizată preparată ca mai sus. În acest scop, fracțiunea liofilizată este resuspendată în mediu de cultură și filtrată steril, astfel încât componentele sale hidrosolubile să fie recuperate și testate. Toate experimentele au fost efectuate în triplu exemplar. Mediile de cultură au fost retrase și înlocuite, cu medii proaspete la fiecare două zile. Celulele au fost crescute într-un incubator în atmosferă umidificată constant, conținând 5% CO₂, la 37°C, pe timp de 17, 7, 3 sau 3 zile, corespunzător primului, celui de-al doilea, celui de-al treilea și, respectiv, celui de-al patrulea experiment. Inhibarea creșterii celulelor a fost măsurată prin numărarea directă a celulelor sau prin măsurarea conținutului total de ADN al unei sușe.

Concentrația de fracțiune liofilizată	Inhibarea celulelor (%)	
	MCF-7	ZR75-1
experimentul 1:17 zile		
1 mg/ml	1,5	2,00
5 ml/ml	14,33	33,6
10 mg/ml	62,66	90,8
experimentul 2:7 zile		
1 mg/ml	3,73	0,97
5 ml/ml	15,7	29,00
10 mg/ml	68,37	66,00
experimentul 3:3 zile		
50 mg/ml	95,8	95,00
100 mg/ml	94,6	98,00
experimentul 4:3 zile		
10 mg/ml	34,4	51,5
20 ml/ml	62,5	70,5
50 mg/ml	95,8	95
100 mg/ml	94,6	98

Procentajele de inhibare a creșterii celulelor, de mai sus, demonstrează faptul că fracțiunea liofilizată poate inhiba, în mod dependent de doză, creșterea celulelor acestor două linii de celule.

Fig. 1 arată că dozele de 50 și 100 mg/ml de fracțiunea liofilizată provoacă, în mod clar, hipoplazia asupra acestor linii de celule, după trei zile de tratament.

Fig. 2 arată că în prezența a 10^{-12} - 10^{-9} M estradiol, celulele tratate reacționează ca celulele de control, nefiind stimulate de către aceste doze de hormon. Totuși, peste 1 nM, celulele martor sunt puternic stimulate, iar concentrația de ADN atinge $3,75 \mu\text{g}$ în prezența a 10^7 M estradiol (față de $0,69 \mu\text{g}$ la celulele martor fără estradiol). La celulele tratate cu 30 și 50 mg/ml de fracțiune liofilizată, ADN-ul măsurat la stimularea maximă este de 1,9 și respectiv $1,8 \mu\text{g}$.

Fig. 2 arată că, constanta de afinitate (K_m) a celulelor tratate pentru estradiol este de 3 până la 16 ori mai mare ($31,3 \text{ nM}$ și $174,0 \text{ nM}$) decât valoarea pentru celulele martor ($11,7 \text{ nM}$), în prezența a 30 și respectiv 50 mg/ml. Aceasta înseamnă că sunt necesare concentrații mai mari de estradiol, pentru obținerea aceleiași creșteri a celulelor atunci, când este prezent extrasul solid liofilizat de cartilajiu. Prin urmare, acest extras diminuează reacția maximală (o inhibă cu 90%) și mărește constanta de afinitate a celulelor tratate, pentru estradiol.

A. Teste *in vivo*

Patru sute de femele de șobolan Sprague-Dawley (cumpărate de la Charles River Co., St-Constant, Québec), au fost adaptate la mediul lor, timp de 12 zile. În acel moment, li s-a administrat 20 mg DMBA/1 ml ulei de porumb (9, 10-Dimetil-1,2-Benzantren; achiziționat de la Sigma Chemical Co.). La trei luni după acest tratament, 240 șobolani, cărora li s-a dezvoltat cancer mamar, au fost selectați și împărțiți în două grupuri. Primul grup a constat din cinci sub-grupuri de șobolani. Șobolanilor din grupurile tratate, li s-a administrat o doză zilnică de concentrație crescândă din extrasul liofilizat în 3 ml apă, timp de opt săptămâni, în timp ce grupul martor a primit același volum de apă. Cel de-al doilea grup a constat

din patru sub-grupuri de șobolani. Șobolanilor din grupurile tratate li s-a administrat de asemenea o doză zilnică din extrasul liofilizat în 3 ml apă, combinat sau necombinat cu supranatantul, timp de zece săptămâni, în timp ce grupul martor a primit același volum de apă. Doar șobolanilor unui sub-grup din cel de-al doilea grup de șobolani tratați cu o concentrație de 3000 mg/kg/zi de extras liofilizat și 3 ml de supranatant, li s-a administrat o injecție intraperitoneală (i.p.), cu o doză mai mică de supranatant (circa 8 mg de proteine în 1 ml apă).

Șobolanii cântăreau 151 - 175 g la începutul celor două experimente și au primit hrană și apă ad libitum. Primul grup de șobolani a prezentat tumori cu diametrul mediu de 0,9 cm, în timp ce, cel de-al doilea grup de șobolani a prezentat tumori cu diametrul mediu de 0,6 cm.

Rezultatele sunt rezumate după cum urmează:

Doze zilnice de extract de cartilagiu	Inhibarea creșterii tumorilor (scăderea diametrului tumorilor față de lotul martor), în %
Experimentul 1: durata 8 săptămâni	
500 mg/kg/zi	2%
1000 mg/kg/zi	4%
3000 mg/kg/zi	14%
5000 mg/kg/zi	15%
Experimentul 2: durata 10 săptămâni	
3000 mg/kg/zi	12%
3000 mg/kg/zi + 3 ml supranatant	18%
3000 mg/kg/zi + 3 ml supranatant + 1 ml injecție i.p. cu supranatant	20%

Aceste rezultate demonstrează faptul că extractul liofilizat conține o componentă activă, care este absorbită în tractul gastro-intestinal și care are efect asupra dimensiunii tumorii. Acest efect ar putea fi un efect direct asupra celulelor tumorale sau un efect mediat, prin angiogeneză.

Aceste rezultate arată, de asemenea, că supranatantul are o activitate care este reflectată de o reducere suplimentară a dimensiunii tumorilor, cu aproximativ 5%.

Aceste rezultate sugerează, de asemenea, că extractul liofilizat poate conține componente active, care nu sunt hidrosolubile și/sau că el poate conține componente reziduale hidrosolubile. Prin urmare, în ultima eventualitate, se poate considera că peletul ar putea fi supus unei reextracții într-o soluție apoasă pentru a recupera, în cea mai mare măsură, componentele hidrosolubile, dacă randamentul poate fi încă îmbunătățit.

Histopatologie

Pentru a evalua non-toxicitatea moleculelor active ale extrasului de cartilagiu, animalele utilizate în experimentele *in vivo*, de mai sus, au fost omorâte prin decapitare și următoarele țesuturi au fost preluate pentru analiză: ficat, plămân, rinichi, inimă, creier, mușchi și glanda mamară. Grăsimea a fost îndepărtată din aceste țesuturi, după care ele au fost fixate pentru două zile în fluid Bouin. După deshidratare în etanol, țesuturile fixate au fost înglobate în parafină. Secțiuni din acestea au fost obținute și montate pe lamele din sticlă, colorate cu hematoxină și vizualizate sub microscop.

Examinarea histologică a relevat faptul că nu a fost vizibil vreun efect nociv, atunci când s-a utilizat cea mai mare doză de extract liofilizat singur (date neilustrate) sau atunci când s-a utilizat extractul liofilizat în combinație cu supranatantul (vezi fig. 3A și 3B, 4A și 4B, 5A și 5B).

Aceasta sugerează că extractul liofilizat și supranatantul au o activitate selectivă de regresie a dimensiunii tumorilor.

În cazul glandei mamare canceroase (vezi fig. 6A și 6B), s-a observat o diminuare importantă a ariei vaselor de sânge. Efectul antiangiogen al acestor molecule active este confirmat prin rezultatele ilustrate și rezumate în fig. 7.

Fig. 7 arată că atunci când a fost utilizată o combinație de extract liofilizat (p.o.) - supranatant (p.o. + i.p) (vezi fig. 6A și 6B), a fost observată o diminuare cu 55% a ariei vaselor de sânge din tumoare.

Diminuarea dimensiunii tumorii s-ar putea datora unei diminuări importante a vascularizației, unui efect direct asupra celulelor tumorale sau a unei combinații a ambelor fenomene. Efectul antiangiogenic al acestor extracte este bine descris mai sus. Efectul hipoplaziant direct a fost observat *in vitro* pe celulele hormono-dependente și rămâne de verificat *in vivo*.

Deoarece rezultatele menționate mai sus au arătat că supranatantul a avut un efect suplimentar efectului extractului liofilizat asupra celulelor ZR75-1, componentele acestuia au fost investigate în continuare.

Obținerea de fracțiuni lichide conținând molecule active

Cartilagiul de rechin a fost recoltat și procesat la fel cum s-a descris mai sus. După centrifugare, peletul a fost dat la o parte, iar supranatantul a fost procesat la fel ca mai sus, până la filtrarea sterilă cu ajutorul filtrului de 0,22 μ m.

În cele ce urmează, supranatantul va fi denumit "fracțiunea filtrată brută", de exemplu produsul rezultat după ultrafiltrare.

Fracțiunea filtrată brută astfel obținută a fost supusă cromatografiei lichide proteice rapide (FPLC).

Condițiile pentru FPLC:

Coloana: Hiload 26 mm x 60 cm Sephacryl S-300

Sistem FPLC: de la Pharmacia

Toate eșantioanele au fost filtrate cu ajutorul filtrului de 0,22 μ m înaintea încărcării coloanei. Soluția-tampon de eluție a fost soluție-tampon fosfat salină (PBS) filtrată și degazeificată timp de 15 min. Volumul eșantionului încărcat a fost, de obicei, 3,2 ml (putea să fie de până la 13 ml). Debitul a fost de 1 ml/min. Au fost colectate fracțiuni de 10 ml. Compușii rezultați prin eluție au fost detectați prin intermediul absorbantei lor în ultraviolet (280 nm). O diagramă de calibrare a fost obținută prin utilizarea unui set de calibrare MW-GF-1000 de la Sigma, acest eșantion de calibrare având același volum ca eșantionul încărcat pentru analiză (3,2 ml). Volumul de eluție al unui eșantion a fost dedus prin reprezentarea grafică a greutății moleculare a compușilor setului de calibrare, în funcție de volumul lor de eluție, din care a fost scăzut volumul gol al coloanei. Volumul gol a fost obținut prin injectarea de albastru dextran (greutate moleculară = 2000000).

Fracțiunile au fost testate pentru activitatea lor pe celule ZR75-1. Fracțiunile de interes au fost identificate, iar caracteristicile lor au fost coroborate, printr-un studiu ulterior (prezentat în continuare).

Caracterizarea adițională a componentelor active, ale fracțiunii filtrate, a fost realizată cu Rotofor (Biorad 170 - 2950; vezi izoelectrofocalizarea de mai jos) și cu filtre Amicon cu diferite valori de separare pentru a obține fracțiuni cu greutatea moleculară de 10 - 30 kD, 30 - 100 kD și peste 100 kD.

Izoelectrofocalizare:

Un preparat de cartilagiul de rechin (46 ml de fracțiune filtrată 1 kg/l) a fost dializată peste noapte cu 4 l de apă pură conținând 5% glicerină la 4°C, utilizând o membrană Spectra cu por #7 MWCO 3500 kD (Spectrum 132110). Soluția dializată a fost amestecată

RO 117590 B1

cu 2,75 ml de amfoliți (Pharmacia #80-1125-B7) pH 3,5 - 10,0 și 0,5 g CHAPS (Sigma C3023; 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amoniu]-1-propan-sulfonat). Volumul a fost completat până la 55 ml cu apă pură. Soluția a fost încărcată în Rotofor. Izoelectrofocalizarea a fost efectuată la 4°C, la o putere constantă de 12 wați (sursa de alimentare cu energie 3000 xi Bioard 165-0554), sub circulație constantă de apă pentru a asigura menținerea temperaturii. La începerea separației, tensiunea a fost de 380 V, iar curentul electric de 31 mA. Atunci când curentul s-a stabilizat (la 14 mA), tensiunea era de 870 V. Izoelectrofocalizarea a fost oprită și au fost colectate 20 fracțiuni.

Fracțiune	Volum (ml)	pH
1	3,7	3,56
2	2,1	4,01
3	2,2	4,18
4	2,3	4,31
5	2,2	4,63
6	2,1	5,03
7	2,5	5,30
8	2,1	5,50
9	2,4	5,81
10	2,5	6,26
11	2,3	7,00
12	2,4	7,29
13	2,4	7,64
14	2,5	7,94
15	2,3	8,32
16	2,5	8,62
17	2,4	8,94
18	2,9	9,30
19	3,1	9,88
20	3,6	10,71

Identificarea acestor proteine a fost realizată prin estimarea greutatei lor moleculare, pe un gel de electroforeză (Laemmli, U.K. (1970) *Nature* (Lond) 227: 680).

Aceste fracțiuni au fost diluate cu un volum de patru ori mai mare, dintr-o soluție tampon de încărcare (vezi Laemmli), iar depunerile de 8 μ l au fost supuse electroforezei, în condiții nereducătoare. Fig. 8 redă profilul electroforetic al fiecărei fracțiuni și al materialului, înainte de izoelectrofocalizare.

Toate fracțiunile au fost puse în sticle sterile sub o hotă cu curgere laminară, trecându-le printr-un filtru steril Millipack-60 cu o porozitate de 0,22 μ m.

RO 117590 B1

Conținutul în proteine al fracțiunilor a fost evaluat prin metoda de dozare Lowry. Niște soluții de 1 kg/2 l (exprimat ca greutatea cartilagiului brut pentru fiecare litru de fracțiune filtrată) au fost testate pe celule ZR75-1 la diferite concentrații, în mediu de cultură. Rezultatele sunt rezumate după cum urmează:

Primul test:

Fracțiunea filtrată a fost liofilizată, resuspendată în PBS și trecută pe FPLC. Nu a fost detectată nici o activitate hipoplazantă (date nefigurate).

Al doilea test:

Teste efectuate pe fracțiuni Rotofor (fracțiunea filtrată a fost concentrată prin evaporare): Identificarea proteinelor

Fracțiuni identificate	Punct izoelectric	Valoare mediană	Greutate moleculară
7-8-9-10	5,30 - 6,26	5,78	29 ± 1 kD
7-8-9	5,30 - 6,26	5,68	60 ± 1 kD
12-13-14	7,29 - 7,94	7,62	48 ± 1 kD
13-14	7,64 - 7,94	7,79	35 ± 1 kD

Al treilea test:

Test efectuat pe fracțiuni FPLC (fracțiunea filtrată a fost concentrată prin evaporare):

Fracțiuni	Greutate moleculară
6 și 7	1 - 2,5 kD

Al patrulea test:

Test efectuat pe fracțiuni de 100 μl obținute cu ajutorul filtrelor moleculare Amicon:

Concentrația testată	Greutatea moleculară	Inhibarea culturilor de celule ZR75-1
100 μg/ml	peste 100 kD	64%
100 μg/ml	între 30 kD și 100 kD	114%
100 μg/ml	între 10 kD și 30 kD	127%
400 μg/ml	sub 10 kD	149%

Fracțiunile FPLC 6 și 7 conțin componente active cu o greutate moleculară foarte mică: între 1 și 2,5 kD.

Efectul hipoplaziant al fracțiunilor poate fi de până la de 33000 de ori mai mare decât cel observat cu extractul liofilizat. Rezultatele de mai sus arată că liofilizarea pare să provoace oarecare pierdere a activității antitumorale directe, a proteinelor conținute în eluat, în timp ce o astfel de pierdere nu a avut loc cu liofilizarea extractului solid. Aceasta sugerează că componentele active incluse în particulele de cartilaj par să fie într-un astfel de mediu, încât sunt mai puțin sensibile la efectul denaturant al liofilizării. Întrucât activitatea hipoplaziantă este sensibilă la liofilizare, în cazul recuperării în apă, este probabil ca adăugarea de stabilizatori sau de agenți protectori la extrasul total sau la o fracțiune anume care conține această activitate înaintea liofilizării să păstreze în mod substanțial activitatea.

665 **Identificarea ulterioară a componentelor active ale eluatului:**

670 Frațiunile active (testate pe celule ZR75-1) sunt recuperate în domeniile următoare de greutate moleculară, determinate prin alt tip de purificare, plecând de la aceeași parte filtrată (1 kg/1), pe o coloană Superose - 12 de 10 mm diametru x 30 cm lungime, utilizând procedurile FPLC și Rotofor, descrise mai sus. A fost ales un debit de 1 ml/min. Au fost colectate 45 fracțiuni de 1 ml.

Frațiunile 20 - 21	Activitate în fracțiuni corespunzând unei greutate moleculare de 70 - 120 kD
Frațiunea 22	Activitate în fracțiuni corespunzând unei greutate moleculare de 60 - 70 kD
Frațiunile 29 - 32	Activitate în fracțiuni corespunzând unei greutate moleculare de 35 - 46 kD
Frațiunile 34 - 35	Activitate în fracțiuni corespunzând unei greutate moleculare de 29 kD
Frațiunile 38 - 39	Activitate corespunzând unei greutate moleculare de 1 -2,5 kD

Specificitate

685 Pentru a evalua specificitatea activității asupra celulelor tumorale, partea filtrată, obținută după ultrafiltrare, a fost testată pe alte celule originale din mezenchim, fibroblaste TENON umane care sunt fibroblaste normale.

B. Teste *in vitro*

a. Pacienți

690 Au fost utilizate doar fibroblastele TENON umane (HTF) de la doi pacienți (unul cu glaucom neovascular, NVG, iar celălalt cu glaucom de unghi deschis primar, POAG).

b. Subculturi și întreținerea HTF

695 Fiecare cultură confluentă a fost spălată și separată cu 0,5 ml de tripsină 0,05%/0,5 mM EDTA (Gipco 610-5300 AG) timp de 5 - 10 min, la 37°C. Apoi s-a adăugat 1,5 ml de mediu DME/F-12, conținând 15% ser bovin fetal (FBS), pentru a neutraliza tripsina /EDTA.

700 Asocierea celulelor a fost realizată, prin triturare, și transferare în flacoane - T de 25 cm², în care s-a adăugat mediu conținând 10% FBS. După obținerea confluenței, fibroblastele HTF au fost transferate în flacoane - T de 75 cm² și, în cele din urmă, de 180 cm². Când s-au obținut suficiente celule, unele dintre acestea au fost utilizate pentru experimentele descrise mai sus, iar altele au fost simultan înghețate pentru păstrarea de mostre, identice, destinate unor experimente viitoare.

c. Protocoale experimentale

705 Când a fost obținută confluența, celule de la un pacient crescând în două sau trei flacoane - T de 180 cm² identice au fost dissociate prin procedura descrisă mai sus. După o scurtă centrifugare de mică viteză, acestea au fost numărate cu un aparat ZMI Coulter Counter 216013, echipat cu dispozitiv 256 - Channelyzer.

710 Pentru toate experimentele *in vitro* care urmează, au fost inoculate aproximativ 50000 de celule în 1 ml de mediu, DME/F-12 conținând 1% FBS în fiecare cuvetă de 16 mm și o placă cu 12 sușe. La 17 h după înmsămânțare, a fost adăugat 1 ml de mediu proaspăt identic suplimentat cu 1% FBS (martori "absoluți"). În funcție de proiectul experimental (vezi cele de mai sus și cele de mai jos), mediul cu 1% FBS a fost sau nu suplimentat cu FG (factor

RO 117590 B1

de creștere) sau cu soluția filtrată 1 kg/2 l (greutate cartilagiu/volum apă). În această zi (ziua 0), câteva eșantioane de celule au fost totodată numărate pentru a determina eficiența acoperirii (care ar trebui să fie egală cu sau mai mare decât 95%).

După 48 h de la începerea experimentelor, celulele au fost clătite și disociate prin procedura menționată anterior și numărate din nou. Numărul de celule a fost exprimat ca un procentaj din cel obținut pentru martorii "absoluți".

Fiecare martor "absolut" sau pozitiv, conținând 1% sau respectiv 5% FBS, și fiecare grup experimental, suplimentat cu 1% FBS și cu un factor de creștere individual sau cu fracțiune filtrată de cartilagiu, au constatat din eșantioane triple.

Fiecare experiment a fost efectuat asupra celulelor unui pacient sau a doi pacienți, în același timp, și a fost repetat cel puțin de două ori.

Stimularea proliferării fibroblastelor prin factori de creștere (GF) sau prin fracțiune filtrată de cartilagiu a fost comparată cu stimularea cu 5% FBS.

În aceste experimente, factorii de creștere, factor de creștere derivat din platelet porc (pPDGF) și factor de creștere de fibroblast bazic recombinant uman (hr bFGF) (primit de dr.P.Brazeau de la Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italia) au fost adăugați în concentrații de 10 - 100 ng/ml în 1% FBS. După 48 h de la începerea experimentului, celulele au fost dispersate cu Trypsin-EDTA și numărate cu aparatul de numărat Coulter. Toate valorile (coloanele 1, 2 și 3), care apar mai jos, reprezintă a douăzecea parte din numărările pe sușă.

Tabel

Pacient B: Glaucom		Sex: Bărbătesc		Vârsta: 53	
HTF					
Ziua -1:	număr de celule pe sușă: 46170				
	DME/F12 - 1% FBS - 1% Pen. Strep				
Ziua 0:	număr de celule pe sușă: 65214				
	DME/F12 - 1% FBS - 1% Pen. Strep				
Ziua 1:	număr de celule pe sușă: 62548				
	DME/F12 1 - 1% FBS - 1% Pen. Strep				
Ziua 2:	număr de celule pe sușă:				
	DME/F12 - 1% FBS - 1% Pen. Strep				
	Eșantion/	1	2	3	AVE.
	placa				SEM
	DME/F12				nr.celule/numărare
					%
					creștere
					martor
Placa #1	1 Ziua 0	3,0	2,8	2,8	62,214
	1% FBS		19	62	53
	2 Ziua +1	2,7	2,9	2,6	62,548
	1% FBS		11	73	93
					65,71
					1,655

755	3 Ziua +2	2,2	2,4	2,1	51,333	1,655	100	
	1% FBS	84	00	91				
	4 Ziua +2	3,0	2,8	3,1	67,446	1,627	131	
	5% FBS	84	34	15			II	
760	Placa #2	DME/F12						
	PDGF 5	Martor	2,5	2,1	2,2	51,931	2,19	100
		(1%FBS)	58	81	16		9	
	6	1 ng/ml	2,4	2,5		56,056	1,228	108
		1% FBS	25	80				
765	7	10	4,0	3,9	4,2	92,116	1,648	177
		ng/ml	80	75	82			III
		1% FBS						
	8	100	4,6	4,3	4,4	100,285	1,442	193
		ng/ml 25	56	50				III
		1% FBS						
770	Placa #3	DME/F12						
	b-FGF							
	9	Martor	2,91	2,5	2,5	59,360	2,429	100
		(1%FBS)	5	33	02			
775	10	1 ng/ml	2,74	2,5	2,7		1,213	101
		1% FBS	4	54	61	60,174		
	11	10	3,60	3,1	3,1	74,234	2,683	125
		ng/ml	6	43	93			
		1% FBS						
780	12	100	4,06	3,0	3,0	75,585	6,307	127
		ng/ml	4	33	26			
		1% FBS						
785	Placa #4	DME/F12						
	CARTILAGIU 13	Martor	2,82	2,5	2,4	58,822	1,877	100
	(1 kg/2 l) (1%FBS)		6	66	86			
	(filtrat)							
	14	1µl/ml	2,72	2,5	2,5	58,837	936	100
		1% FBS	9	76	75			
	15	10	2,64	2,4	2,5	57,643	798	98
790		µL/ml 3	93	84				
		1% FBS						
	16	100	2,91	2,8	2,7	58,483	2,461	99
		µl/ml 8	83	66				
		1% FBS						

II P < 0,02

795 III P < 0,01 Determinat prin testul Student-Fisher

În timp ce factorii de creştere ca PDGF şi bFGF prezintă o activitate de stimulare supra HTF, nu s-a observat nici un efect, pozitiv sau negativ, atunci când aceste celule sunt crescute în prezenţa cartilagiului filtrat (1 kg/2 l). Nu s-a putut observa nici un efect hipoplaziant. Aceasta sugerează că fracţiunea filtrată are un efect hipoplaziant sau citotoxic, ce este

800

specific celulelor tumorale, cu nici un efect detectabil asupra celulelor normale. Același extract de cartilagi nu a avut vreun efect nici asupra altui tip de celule fibroblaste, HSF (fibroblaste de piele umană; date nefigurate). Deși nu s-au efectuat teste, se presupune că nici fracțiunea liofilizată nu prezintă efecte asupra celulelor normale.

Întrucât nu suntem primii care au tratat cu mare interes extractele de cartilagi, am verificat caracterul unic al extractului lichid, de cartilagi de rechin, preparat, conform invenției, în teste de comparație cu două produse descrise sau deductibile din stadiul tehnicii și anume produsele preparate prin procedeul descris de Balassa (US 4822607) și respectiv de Oikawa și colab. (op.cit.).

Oikawa ș.a. descriu o metodă prin care se obțin două fracțiuni principale, una cu molecule a căror greutate moleculară este cuprinsă între 1 și 10 kDa, iar cea de-a doua având componente mai grele decât 10 kDa. Ei atribuie proprietăți antiangiogene doar primei fracțiuni, cealaltă fiind declarată lipsită de orice activitate antiangiogenă în testul CAM. Pentru o comparație adecvată cu produsele descrise de Oikawa, am fracționat extractul nostru lichid total, în două fracțiuni corespunzătoare, și am reținut-o pe cea având între 1 și 10 kDa. Întrucât Balassa descrie un procedeu pentru extragerea unui extract lichid total, am comparat extractul nostru lichid total de cartilagi (între 1 și 500 kDa) cu produsul preparat prin reproducerea metodei lui Balassa, înlocuind cartilagiul de vițel ca material de pornire cu cartilagiul de rechin. Presupunem că dacă Balassa și Oikawa descriu un procedeu echivalent, rezultatele obținute asupra FPLC și HPLC s-ar suprapune în mod substanțial, iar produsele testate în testul CAM ar prezenta o activitate similară cu cea a produsului nostru. Toate eșantioanele au fost aduse la o concentrație finală de $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (greutate uscată/volum al soluției) înainte de cromatografia FPLC și HPLC. Produsul descris de Oikawa a fost centrifugat și filtrat înaintea cromatografiei deoarece conținea material insolubil.

A) condiții FPLC: Superose 12 (*Pharmacia*); coloana de filtrare cu gel.

B) condiții HPLC: coloana CS-S-hexil de $5 \mu\text{m}$, $25 \times 0,94 \text{ cm}$, CSC #050 - 0,85; coloana cu reversare de fază.

Eșantioanele de cartilagi de rechin extrase prin cele trei metode au fost etichetate (cu greutatea uscată estimată per volum al soluției) după cum urmează:

1/ DUP este preparatul conform invenției, fracționat pentru a conține molecule între 1 și 500 kDa ($12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$);

2/ BAL este preparatul conform rețetei Balassa ș.a. ($12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$);

3/ OIK este preparatul fracțiunii 3 conform Oikawa ș.a. ($270 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Toate eșantioanele au fost aduse la o concentrație finală de $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (greutate uscată/volum) înainte de orice analiză. Eșantionul OIK a avut o mare cantitate de material insolubil, care a putut fi peletizat prin centrifugare la 13200 rot./min. sau prin filtrare printr-o membrană de $0,2 \mu\text{m}$. Filtrarea sau concentrarea materialului insolubil a fost esențială, înainte de FPLC și HPLC (A, B).

A) Rezumatul rezultatelor FPLC

Eșantioanele au fost trecute printr-o coloană de filtrare cu gel Superose 12 (10/30), cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) drept eluant la un debit de $0,5 \text{ ml/min}$ (viteza diagramei = $0,25 \text{ cm/min}$). O parte de $100 \mu\text{l}$ din eșantioanele a căror concentrație a fost ajustată, a fost filtrată printr-o membrană de $0,2 \mu\text{m}$ înaintea injectării OD280 a fost monitorizat.

Coloana a fost calibrată cu următoarele standarde (greutatea moleculară în daltoni): catalaza (232000), aldolaza (158000), albumina (56000), ovalbumina (44000), chimotripsina (25700), ribonucleaza (13700), insulina (5700), lanț A de insulină (2500), lanț B de insulină (3500), bacitracin (1450), vitamina b-12 (1355). Greutățile moleculare ale vârfurilor majore au fost calculate cu ajutorul următoarei ecuații: $\log_{10} \text{MW} = 7,52 - 0,212 \times \text{RT}$, unde RT = volumul eluției în ml. $R^2 = 0,976$. Volumul total al coloanei (V_T) a fost de $21,93 \text{ ml}$, determinat utilizând citidina (246 Da). Volumul gol a fost determinat (V_0) ca fiind $8,38 \text{ ml}$ cu dextran albastru ($2 \times 10^6 \text{ Da}$).

În fig. 10A, eșantionul nostru DUP a avut un prim vârf major (1), care, prin eluție la 18,76 ml, a dat o greutate moleculară de 3500 Da. Vârfurile ulterioare la 22,7 ml (2) și 27,3 ml (3) au fost dincolo de volumul total al coloanei (21,93 ml, determinat cu ajutorul citidinei).

855 Aceste vârfuri par a avea o oarecare afinitate pentru matricea coloanei.

În fig. 10B, eșantionul BAL a avut un mic vârf (1) prin eluție lângă volumul V_o al coloanei (8,4 ml), un vârf (2) la 18,5 ml (4000 Da) și două vârfuri prin eluție, dincolo de volumul V_T , (3) la 22,6 ml și (4) la 28,2 ml.

860 În fig. 10C, eșantionul OIK a avut, de asemenea, un mic vârf (1) la volumul V_o , un vârf (2) la 18,9 ml (3300 Da), un vârf (3) la 21,5 ml (1000 Da) și un vârf mic (4) la 27,3 ml.

865 Comparând aceste eșantioane, trebuie remarcat faptul că, în afară de vârful de 3300 Da, benzile majore ale eșantionului DUP nu au fost observate la aceeași intensitate la celelalte eșantioane. Eșantionul OIK a părut să aibă o mică parte din vârful de 27,3 ml. Eșantionul BAL a avut un vârf care a migrat la 28,2 ml, care s-ar putea corela cu unul dintre vârfurile minore ale eșantionului DUP.

B) Rezumatul rezultatelor HPLC

870 Pentru HPLC cu ajutorul unei coloane cu reversare de fază-hexil, au fost monitorizate simultan OD210 și OD280. Părți de 50 μ l din eșantioanele centrifugale (toate la 12 μ g/ μ l) au fost încărcate și supuse eluției cu 100% H_2O . Vârfurile pentru fiecare cromatogramă au fost etichetate conform OD210 (eg.1), iar conform OD280 vârfurile au fost notate cu '(eg.1)'. Volumul V_o al acestei coloane a fost de 5,5 ml (1,4 min.).

875 În fig. 11A, eșantionul DUP a avut trei vârfuri majore care au fost observate prin OD210 (1, 2, 3) și două vârfuri minore (4, 5). Două vârfuri laterale au fost observate pe vârful 1, etichetate cu 1a și 1b. Vârfurilor 1, 1a, 1b și 3 le-au fost asociate niște absorbante OD280 semnificative. În comparație, absorbția corespunzătoare OD280 pentru vârful 2 este mult mai mică față de OD210.

880 În fig. 11B, eșantionul BAL a prezentat mai multe vârfuri OD210, dar intensitățile au fost mai mici față de vârfurile DUP. În măsura în care suprapunerea vârfurilor ar putea indica identitatea moleculelor, doar vârfurile 3 și 7 din eșantionul BAL par să fie corelate cu timpii de retenție ai vârfurilor din eșantionul DUP (vârful 1a sau 1b și respectiv vârful 4)..

885 În fig. 11C, în extrasul OIK au fost observate doar trei vârfuri majore (1, 2, 3). Vârfurile 1 și 3 ar putea fi corelate cu vârfurile 1 și 3 din eșantionul DUP, dar în cromatograma OIK nu au fost observate vârfurile laterale ale vârfului 1. Înălțimea vârfurilor din eșantionul OIK a fost mai mică decât pentru eșantionul DUP. Deși rezultatele FPLC și HPLC sunt caracteristice pentru produse diferite, am verificat activitățile antiangiogene ale celor trei produse în teste CAM.

Test CAM:

890 Testele CAM au fost efectuate mai întâi utilizând diferite concentrații de protamină (37, 75 și 150 μ g). Un disc din metilceluloză conținând apă și alt disc conținând protamină, ca martor pozitiv, au fost dispuse pe membrană corloalantoică a unui embrion de pui (n = numărul de embrioni analizați). Pe fiecare disc a fost dispusă o garnitură inelară pentru a facilita localizarea lor. În ziua următoare, nivelul de vascularizare din interiorul fiecărei garnituri inelare a fost evaluat de către o pereche de oameni de știință prin metoda oarbă uzuală. Scara de evaluare pentru testul CAM bazat pe nivelele 1-2-3 a fost următoarea: (nivel 3)

895 Vascularizare normală în comparație cu cadranul orizontal opus sau cu cadranul corespun-

900 dent al unui embrion martor; (nivel 2) Vasele de sânge intră în interiorul garniturii inelare, dar dispar la jumătatea parcursului. Vasele de sânge majore traversează garnitura inelară, dar traiectoria lor este afectată, în mod clar, ramificare diminuată, arie vasculară diminuată a cadranului în vecinătatea garniturii inelare: (nivel 1) Nu există vase de sânge sau vase de sânge deviate în interiorul garniturii inelare. Vasele de sânge nu cresc dincolo de garnitura

inelară, cu excepția celor care o ocolesc. Aria vasculară a cadranului este, în mod clar, diminuată în vecinătatea garniturii inelare. În fig. 12, valorile de deasupra fiecărei coloane redau evaluarea finală a fiecărui eșantion. Pentru a compara semnificația diferențelor dintre cele două discuri amplasate pe același ou, a fost utilizat testul statistic Wilcoxon. Se poate observa, conform așteptărilor, o relație între doză și reacție.

905

Fracțiunile de extract DUP situate sub și respectiv peste 10 kDa au fost testate în aceleași condiții. Ele au apărut ca având aceeași putere de inhibare a neovascularizării (fig. 13).

Extractul nostru total DUP a fost comparat cu produsul preparat după procedeul propus de Balassa, BAL. În produsul BAL nu s-a evidențiat o activitate angiogenă semnificativă (fig. 14).

910

Extractul brut DUP a fost comparat cu fracțiunea 3 propusă de Oikawa, OIK. Produsele DUP și OIK au fost aproape echivalente (fig. 15). Indicațiile date de Oikawa ș.a. se îndepărtau totuși de invenție, prin aceea că menționau că nu s-a putut detecta vreo activitate în fracțiunea cu greutatea moleculară mai mare decât 10 kDa, ceea ce este în contradicție cu rezultatele noastre din fig. 13.

915

Prin urmare, în ciuda similarităților dintre procedeul propus de Balassa și cel conform invenției, produsele obținute prin cele două procedee nu sunt aceleași, în mod clar.

Cele două produse cunoscute care au fost comparate cu al nostru sunt considerate ca procedee clasice pentru a prepara extracte de cartilagi. Rezultatele de mai sus arată că procesul conform invenției furnizează produse cu o activitate neașteptat de bună, în ceea ce privește activitatea antiangiogenă.

920

Teste clinice

Înainte de începerea testelor clinice preliminare, fracțiunea filtrată brută, obținută după ultrafiltrare, a fost concentrată în proporție de 2:1 și de 20:1, obținându-se o fracțiune filtrată activă îmbogățită. Aceste niveluri de concentrare au fost obținute cu ajutorul unei coloane de filtrare cu debit tangențial, având o porozitate de 1000 Daltoni, care a redus volumul eluatului de 2 și de 20 de ori. Fracțiunea filtrată concentrată a fost filtrată cu un filtru milipor cu porozitatea de 0,22 μ m. Atunci când cartilagiul a fost procesat prin metoda alternativă de centrifugare (utilizând centrifuga CEPA cu o membrană cu porozitatea de 30 μ M), o concentrare de 10:1 a permis obținerea unui extract concentrat, având aproape același nivel proteic ca și extractul concentrat în proporție de 20:1 de mai sus, de exemplu, aproximativ 12 - 25 mg/ml (metodă îmbunătățită) în loc de aproximativ 8 - 12 mg/ml (metodă la scara laboratorului). Fracțiunea filtrată concentrată în proporție de 10:1, sterilă, a fost distribuită în porții de 7 ml (aproximativ 85 mg de proteine) în flacoane sterile, care au fost congelate la - 80°C peste noapte și stocate ulterior la - 20°C până la utilizare. Diferența majoră dintre fracțiunea filtrată brută și cea concentrată rezidă în concentrația de proteine. Trebuie remarcat faptul că metoda utilizată pentru determinarea conținutului proteic măsoară conținutul de azot total și nu numai proteinele (metoda Kjeldahl). Aceasta poate explica de ce concentrația de proteine nu crește proporțional cu nivelul concentrației de volum, după cum este în mod obișnuit cazul atunci când conținutul proteic este determinat prin metoda Lowry. Prin urmare, se presupune că etapa de concentrare permite filtrarea apei precum și a compușilor de azot, cu greutate moleculară mică.

925

930

935

940

Efect antiangiogen

Fracțiunea filtrată concentrată a fost utilizată pentru tratarea bolilor dependente de angiogeneză. În practica umană au fost testate trei tipuri reprezentative, diferite, de boli dependente de angiogeneză; primul tip a fost cancer (cancer de prostată), al doilea tip au fost dereglări dermatologice (psoriazis), iar al treilea tip a fost artrita. Exemplele de mai jos vor ilustra și vor indica cel puțin activitatea antiangiogenă a extrasului lichid.

945

950 Dintre bolile dermatologice, a fost ales psoriazisul. Între cazurile de psoriazis, testate, merită remarcată diferența dintre cazurile de psoriazis complicate cu hipercheratoza și cele necomplicate. Componenta de cheratoză reprezintă formarea unui înveliș cornificat sub forma unei plăci. O astfel de placă este o barieră fizică ce împiedică pătrunderea eficientă a ingredientelor active către vasele de sânge.

955 Un pacient suferind de un cancer al prostatei a încercat, voluntar, o fracțiune filtrată de cartilagiu, concentrată în proporție de 10:1. Acest pacient a fost supus unei serii de terapii convenționale, succesive, care au avut succes temporar. Recent, el a început să consume extract de cartilagiu după ce cancerul său a recidivat.

960 Alți voluntari, suferind de artrită și luând sau nu, în prealabil, medicație (prednison), au început să consume un extract concentrat de cartilagiu. Starea lor s-a îmbunătățit, după cum s-a verificat prin reducerea durerilor și a rigidității încheieturilor.

965 Rezultatele prezentate mai jos sunt foarte încurajatoare și prezic eficiența părții filtrate brute și a fracțiunilor din aceasta în tratamentul tuturor bolilor dependente de angiogenează și nu numai al celor testate. În măsura în care o boală are o componentă angiogenă, se presupune că extractul de cartilagiu, conform invenției, va fi eficient, în acest caz, cu condiția ca el să intre într-o compoziție care să conțină o cantitate eficientă, de extract, și ca această compoziție să fie într-o formă adecvată unei administrări corespunzătoare. Prin urmare, invenția nu este limitată la următoarele compoziții specifice destinate utilizării în tratamentul bolilor angiogene, întrucât specialistul în domeniu va fi capabil să derive numeroase compoziții a căror alegere este ghidată de către modul de administrare și de țesutul bolnav

970 căruia îi sunt destinate. Compozițiile pot fi administrate pe diferite căi, de exemplu, topic, oral, sublingual, rectal, intravenos, intramuscular, prin difuzie etc.

Datorită gustului și mirosului de pește ale extractului de cartilagiu, acestor compoziții li se pot adăuga agenți de aromatizare, pentru a favoriza acceptarea lor de către pacienți.

975 **Psoriazis**

Următoarea compoziție dermatologică a fost realizată și testată pentru a verifica eficacitatea ei asupra pacienților suferind de psoriazis:

- EMULGAGE™ CLB 29% (g/g)
- fracțiune filtrată brută de concentrație 20:1 69,5% (g/g)
- 980 - GERMABEN™II 1% (g/g)
- Lavandula Angustifolia 0,5% (g/g)

985 EMULGADE™ CLB, un amestec de esteri de stearat, alcooli grași și emulsificatori neionici (achiziționat de la Henkel Canada Ltd.) a fost încălzit la 65 - 70°C, fiind agitat. Încălzirea a fost oprită în timp ce amestecul era încă agitat. Atunci când amestecul a atins o temperatură de 45°C, au fost adăugate uleiul esențial *Lavandula Angustifolia* și agenții de conservare GERMABEN™II (diazonidiluree 30%, metilparaben 11%, propilparaben 3% și propilen glicol 56%; achiziționat de la Sutton Laboratories, NJ, U.S.A.). Când temperatura amestecului a atins 30°C, a fost adăugat extractul de cartilagiu. Compoziția astfel obținută a fost o cremă omogenă neunsuroasă; prin varierea procentajului de EMULGADE™, pot fi obținute

990 alte forme de compoziții dermatologice cu diferite viscozități, în conformitate cu instrucțiunile producătorului (lapte, loțiune, unguent). Pot fi utilizate alte excipiente sau mijloace purtătoare pentru a se obține paste, geluri și orice alte forme de preparate transdermice.

995 Formula de mai sus a fost administrată de două ori pe zi pe o perioadă de 12 săptămâni unui lot de 9 pacienți (aplicare topică) suferind de psoriazis, care reacționaseră la terapiile convenționale încercate, dar deveniseră rezistenți la acestea, după un timp. Pentru acest studiu, au fost selectați pacienți cu extindere similară și simetrică a psoriazis-ului pe ambele membre. Aceste teste au fost desfășurate după metoda oarbă dublu, nici

dermatologul și nici pacienții neștiind care dintre părțile afectate a fost tratată cu compoziția conținând extractul de cartilagiu și care a fost tratată cu o compoziție-martor. O îmbunătățire remarcabilă a fost observată în cazurile a cinci pacienți al căror psoriazis nu era complicat cu hipercheratoză, rezultatele au fost medii. Fotografii ale unor părți ale corpurilor a doi pacienți sunt prezentate în figurile 9A și 9B. În fig. 9A, se demonstrează că un pacient afectat de psoriazis cu hipercheratoză a prezentat totuși o reducere foarte semnificativă a eritemului, asociată cu lipsa pruritului, după doar o lună de tratament. Hipercheratoza a rămas, totuși, importantă. Fotografiile celui de-al doilea pacient suferind de psoriazis necomplicat cu hipercheratoza (fig. 9B) arată o mult mai mare îmbunătățire după un tratament de trei luni. Întrucât psoriazisul apare ca fiind o boală multifactorială, se presupune că reacția pacienților depinde de importanța implicării unor componente ca angiogeneza și inflamarea în stabilirea și perpetuarea acestei stări. Activitatea antiangiogenă este prezentă, în mod sigur, în extractul, așa după cum a rezultat în cazul șobolanilor tratați cu DMBA și în testele CAM. A fost verificată și activitatea antiinflamatorie. Este probabil că s-ar obține rezultate mai bune, dacă acest fel de formulă ar fi complementat cu alți agenți terapeutici, care se adresează altor factori implicați (agenți cheratolitici, agenți antiinflamatori suplimentari, antihi-staminice, imunosupresori, etc.).

Această complementare ar putea lua forma modificării formulei, pentru a include o cantitate eficientă dintr-un agent cheratolitic, de exemplu. S-ar putea realiza, de asemenea, prin administrarea separată a unui astfel de agent terapeutic complementar, în același timp sau alternativ cu aplicarea acestei formule topice. În plus, medicația complementară nu trebuie să fie neapărat administrată pe aceeași cale.

Formula de mai sus nu a prezentat efecte sistemice (efectul fiind limitat la zonele tratate) sau efecte secundare, în ciuda proporțiilor mari în care s-a aflat extractul de cartilagiu.

Cancer

Un pacient suferind de cancer al prostatei a încercat fracțiunea filtrată concentrată în proporție de 10:1. În 1986 a fost diagnosticat un adenocarcinom. La acel moment, pacientul a fost supus radioterapiei. În 1991, nivelul PSA (antigen de ser prostatic) a fost de 138 $\mu\text{g/l}$, în timp ce limita normală maxim admisibilă este de 4 $\mu\text{g/l}$. Pacientul a fost supus atunci unei terapii complet diferite, prin castrare, combinată cu terapie antiandrogenă (EUFLEX™). Acest tratament a fost eficient timp de trei ani, după care nivelul PSA a început să crească din nou. Începând din iunie 1994, acest pacient consumă fracțiunea filtrată concentrată în proporție de 10:1 (doza sublinguală zilnică de aproximativ 75 mg/7 ml de extras, echivalentul a aproximativ 1 - 1,5 mg/kg corp/zi). Chiar dacă o cantitate semnificativă din această doză este înghițită, ea este probabil absorbită în tractul gastro-intestinal în proporții substanțiale, dacă ne bazăm pe rezultatele obținute în cazul animalelor tratate cu DMBA. Nivelul PSA a scăzut treptat de la 12 la 0,9 $\mu\text{g/l}$, adică mult sub limita normală a nivelului PSA (ultimele rezultate au fost obținute în mai 1995). Acest regim al dozelor poate fi modificat după dorința în conformitate cu calea de administrare, cu biodisponibilitatea ingredientelor active și cu agresivitatea cu care se dorește a fi controlată patologia. În acest moment, non-toxicitatea a fost verificată asupra șobolanilor (vezi exemplele de mai sus) și asupra oamenilor.

În cadrul celui alt experiment *in vivo* efectuat asupra șobolanilor tratați cu DMBA, rata dozării extractului lichid a fost de aproximativ 190 - 220 mg de proteine/kg corp, ceea ce se presupune că a avut o mare contribuție la reducerea ariei vaselor de sânge ale cancerului (55% atunci când s-a combinat cu cantități mult mai mari de proteine din extractul liofilizat). Se presupune, prin urmare, că o doză de aproximativ 0,1 - 200 mg/kg corp/zi reprezintă un domeniu rezonabil aproximativ de doze mediane (ED_{50}) pentru tratarea cancerului, cel puțin parțial prin reducerea sau eliminarea angiogenezei.

Artrita

Niște pacienți suferind de artrită au încercat, ca voluntari, între una și două unități de 7 ml de extract lichid total pe zi, timp de câteva luni. Acești pacienți au constatat îmbunătățirea stării lor, în mod treptat, prin recuperarea funcțiilor articulațiilor, diminuarea durerilor și a inflamațiilor (până la aproximativ 60%). Întrucât artrita are componente angiogene și inflamatorii, efectul de mai sus poate fi atribuit activităților antiangiogene și antiinflamatorii ale extractului de cartilagiu.

Efect non-anti-angiogen**Acnee**

Chiar dacă acneea nu este, potrivit cunoștințelor inventatorilor, clasificată ca o boală sau dereglare având o componentă angiogenă, a fost totuși tentată testarea extractului lichid de cartilagiu asupra unor pacienți afectați de acnee. Pentru experimentarea extractului de cartilagiu asupra pacienților afectați de acnee, a fost realizată următoarea formulă de gel:

Exemplu

CARBOPOL™ 1,2%

Apă purificată 77,2%

NaOH 0,3%

PHENOXETOL™ 0,3%

Extract de aloe 40 X 0,5%

Extract de cartilagiu dublu concentrat 20%

Extractul de cartilagiu dublu concentrat conține 9 - 12 mg/ml proteine. Formula asigură o îmbunătățire remarcabilă a aspectului pielii pacienților afectați de forme mai mult sau mai puțin severe de acnee (acnee inflamatorie și acnee chistică).

Aceste rezultate pot fi datorate unui efect antiangiogen (relevând astfel o componentă angiogenă a acneei), sau pot fi datorate unor ingrediente active care au alt efect decât cel antiangiogen (un efect antiinflamator, de exemplu, conform celor de mai jos).

Toate rezultatele obținute în testele clinice de mai sus arată marele potențial al extractului lichid de cartilagiu în tratamentul bolilor dependente de angiogeneză și/sau inflamatorii. Cantitatea de extract de cartilagiu, precum și formulele de utilizare a acestuia, pot fi variate după dorință pentru a satisface cerințele specifice.

Se poate remarca faptul că, pe baza conținutului proteic, toate compozițiile pot conține o gamă largă de doze de extract de cartilagiu. În cadrul celor trei categorii anume de cazuri testate, au fost utilizate dozări și/sau formule foarte diferite. Pentru toate aplicațiile prevăzute (de la picături oftalmice până la formule medicamentoase dermatologice și contra cancerului), se presupune ca o concentrație de proteine finală minimă a extractului lichid total ar putea fi foarte mică (de la aproximativ 0,1 mg/ml). Această gamă inferioară a dozelor depinde de accesibilitatea și de pătrunderea ingredientelor active până la locul acțiunii, precum și de capturarea eficientă a acestor ingrediente și de sensibilitatea sau reacția țesutului respectiv la inhibitorii angiogeni. Limita superioară a concentrației de proteine finale în formulele pentru anumite aplicații nu este cunoscută. Concentrațiile finale superioare testate au fost de aproximativ 9 mg/ml de proteine în formula pentru cazurile de psoriazis și de aproximativ 12 mg/ml în unitatea de doză de 7 ml administrată în cazul cancerului de prostată.

Așa după cum s-a menționat mai sus, extractul lichid de cartilagiu de rechin își poate pierde o parte dintre activități atunci când este liofilizat în soluție apoasă. Totuși adăugarea de stabilizatori sau de agenți protectori, așa după cum se cunoaște în stadiul tehnicii, înainte de liofilizare, poate păstra activitățile sensibile și face posibilă administrarea de doze mai mari din extractul de cartilagiu în stare uscată.

Extractul de cartilagiu ca antagonist al evenimentelor mediate de protein chinaza C (PKC)

1095

Publicații recente au arătat că activarea PKC a făcut cheratinocitele normale să producă niște cantități mărite de interleukin-8 (IL-8), un mediator al inflamației (Chabot-Fletcher și colab. (1994) J.Invest.Dermatol. 103: 509-515). În plus, cheratinocitele psoriatică produc foarte mari cantități de IL-8, care încurajează ulterior neovascularizarea în plăcile psoriatică (Nickoloff și colab. (1994) Am.J.Pathol. 144: 820-828). Întrucât extractul de cartilagiu s-a arătat a fi foarte promițător în tratamentul psoriazis-ului, efectul său a fost testat asupra cheratinocitelor la care PKC este activată de către acetat de triformol (TPA), cunoscut ca favorizant al acestei căi de transducție celulară.

1100

Fig. 16 arată că nivelul de diferențiere al cheratinocitelor a fost mărit de 5 ori cu TPA. Cartilagiul de rechin, în sine, nu a avut nici un efect asupra formării de înveliș cornificat. Totuși, adăugarea de extract de cartilagiu de rechin a inhibat formarea de înveliș, cornificat indus de TPA cu mai mult de 60%. Nu știm dacă inducerea prin TPA imită cheratinocitele psoriatică. Dacă este așa, aceste rezultate sugerează că, cartilagiul poate să nu aibă nici un efect asupra cheratinocitelor normale *in vivo*, dar poate avea efect asupra cheratinocitelor psoriatică (sau activate). Inhibarea sau producerea de IL-8 în cheratinocite activate prin TPA, precum și în plăci psoriatică sau cheratinocite psoriatică de către extractul de cartilagiu rămâne de verificat. Scăderea nivelurilor de IL-8 ar reprezenta o confirmare a efectelor anti-inflamatorii și antiangiogene ale acestui extract.

1105

1110

Activitatea antiinflamatorie este separată de activitatea antiangiogenă în extractul de cartilagiu de rechin

1115

Întrucât angiogeneza este, adesea, asociată cu inflamațiile, în numeroase boli, ar fi de dorit să se evidențieze fiecare activitate, separat, în extractul de cartilagiu. În această privință, pentru testarea activității antiinflamatorii și de calmare a extractului a fost ales un model de iritare a pielii în cadrul căruia nu este suspectată apariția angiogenezei. Pentru studiu au fost aleși nouă voluntari prezentând o istorie a sensibilității la "balsam de Peru". Compușii testați au fost după cum urmează:

1120

1. Cartilagiu de rechin, în concentrație 1:1, 50% în mediu D-MEM
2. Cartilagiu de rechin, în concentrație 1:1, 20% în mediu D-MEM
3. Cartilagiu de rechin, în concentrație 1:1, 10% în mediu D-MEM
4. Cola nitida (Indena) 10% Hidro-alcool 1:1.

1125

Cei patru compuși testați au fost aplicați pe antebrațele ventrale, ale voluntarilor din lot. Materialul a fost lăsat să fie absorbit, timp de 20 min, după care pe locurile testate a fost aplicat "balsam de Peru", un iritant. Iritarea pielii a fost măsurată din punctul de vedere al gradului de înroșire a pielii. Gradul de înroșire a fost măsurat cu un aparat Minolta Chromameter și comparat cu martorii pozitivi și negativi. Martorul pozitiv a fost reprezentat de culoarea pielii tratate doar cu "balsam de Peru", iar martorul negativ a fost reprezentat de o zonă de piele tratată cu soluție de Cola și încercată ca produsele testate. Semnificația statistică a fost calculată prin două teste-T de probabilitate.

1130

Fig.ura 17 indică faptul că, Cola la 10% a fost activă 70%. Cartilagiul de rechin a avut o activitate antiiritantă de 58% și 60% în concentrațiile de 20% și respectiv 10%. Nu s-a înregistrat un efect doză-reacție. Aceste rezultate sugerează că extractul de cartilagiu conține activitate antiinflamatorie și calmantă, care este separată de un efect antiangiogen.

1135

Activitate anticlagenolitică**Cromatografie HPLC**

Un eșantion de 980 ml de extract lichid (DUP) a fost filtrat printr-o membrană cu valoarea de separare de 10 kDa într-o unitate de ultrafiltrare cu debit tangențial (PELLICON™, Millipore). Unitatea a fost mai întâi clătită cu un litru de H₂O. Producțiile finale

1140

au fost de 480 ml de fracțiune > 10 kDa și 1,8 l de fracțiune < 10 kDa. Fracțiunea < 10 kDa a fost concentrată prin evaporare până la 180 ml (< 10 - 10x). De opt ori porții de 100 μ l de < 10 - 10x au fost încărcate în coloana CDC-S Hexyl, 5 μ m HPLC (25 x 0,94 cm) și supuse eluției mai întâi cu 100% H₂O la 4 ml/min; apoi la 8,5 ml/min cu 100% MeOH. Fracțiunile au fost colectate corespunzător vârfulor OD₂₁₄.

Au fost colectate cinci fracțiuni (vezi fig. 18): Fr1, Fr2, Fr3, Fr4 și Fr5. Primele trei fracțiuni includ cel puțin un vârf major.

Teste de collagenază

Testele de collagenază s-au efectuat pe aceste eșantioane, utilizând collagenaza de piele umană, recombinantă, tip 1 (MMP1) utilizând un substrat peptidic fluorogen (testul 1) și un substrat de collagen (testul 2).

Testul 1

Acest test este descris în Knight și colab. (19927 FEBS Let. 296, 263 - 266). Metoda utilizează un substrat peptidic fluorogen (Mca-pro-leu-glu-leu-Dpa-ala-arg-NH₂) imitând zona activă a metaloproteinazelor. Acest substrat are o grupare fluorescentă (Mca) la un capăt și o grupare de anulare a fluorescenței (Dpa) la celălalt. În substratul intact, gruparea de anulare maschează în mod eficace fluorescența. La clivajul enzimatic al substratului, fluorescența din tubul de încercare crește.

Activarea collagenazei este descrisă în Weingarten și colab. (1985) Biochemistry 24, 6730. 1 μ g a fost diluat la 100 μ l cu 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 7,5, 1 μ l la 10 mg/ml soluție de tripsină (în 1 mM HCl) s-a adăugat și s-a incubat timp de 15 min. la 20°C. Activarea a fost încheiată prin adăugarea a 10 μ l de inhibitor de tripsină de soia (SBTI, 5 mg/ml). Fiecărei microcuvete i s-a adăugat:

25 sau 50 μ l inhibitor (adus la 50 μ l cu H₂);

40 μ l 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7,5;

8 μ l collagenaza activată (67 ng final); și

2 μ l substrat (1 mM soluție-mamă în DMSO, 20 μ M final).

Fluorescența a fost înregistrată la λ_{ex} = 328 nm, λ_{em} = 393 nm.

Rezultatele arată că Fr1 este cea mai activă fracțiune în inhibarea collagenazei (figura 19). În toate celelalte fracțiuni este prezent un nivel inferior de activitate. Atunci când a fost testată pe collagenază de mormoloci vertebrați, enzima a fost inhibată semnificativ de către extractul de cartilaj de rechin. (EC50 de aproximativ 10 - 20 μ g/ml).

Testul 2

Acest test este descris în Welgus și colab. (1979) JBC 256, 9511-9516. Metoda utilizează SDS-PAGE pentru a examina clivajul prin collagenază, tip 1 (MMP1). Collagenaza tip 1 face o singură separare în molecula de collagen nativă, dând două fragmente cu mărimea de 75% și 25% din mărimea collagenului original. După clivare timp de câteva ore, reacția este monitorizată prin separarea produselor din substrat prin SDS-PAGE. Raportul dintre collagen clivat și collagen neclivat este stabilit vizual după colorarea gelurilor cu albastru Comassie (sau colorant de argint).

21 ng de collagenaza activată (vezi testul 1) au fost adăugate la 5 μ g de collagen de piele de vițel (Worthington) $\pm$ inhibitor într-un volum final de 20 μ l. Reacțiile au fost incubate timp de 16 h la 35°C, apoi stopate prin adăugarea de SDS-PAGE cu 40 mM EDTA, fierte și încărcate pe un gel 8%. Rezultatele sunt rezumate în următorul tabel.

RO 117590 B1

Eșantion	Colorare collagen	Colorare fragment de collagen
Doar collagen (C)	++++	-
C + Enz	+	+++
C + Enz + EDTA	++++	-
C + Enz + DUP	+	++
C + Enz + Fr1	++++	-
C + Enz + Fr2	+++	+
C + Enz + Fr3	+++	+
C + Enz + Fr4	+++	+
C + Enz + Fr5	+++	+
C + Enz + > 10 kDa	+	+++

EDTA 40 mM a inhibat colageneza. Extrasul lichid total DUP a prezentat o activitate anticolagenolitică slabă. Frațiunile de la 1 la 5 au fost active; cea mai activă a fost fracțiunea 1. Frațiunea cu greutatea moleculară mai mare decât 10 kDa nu a prezentat nici o activitate inhibitorie semnificativă.

Compoziții cosmetice

Testele și încercările de mai sus au arătat că extractul de cartilagiu își poate găsi numeroase aplicații medicale. Printre diversele activități recuperate în acest extract, efectul anticolagenolitic, cel antiinflamator și efectul inhibitor asupra diferențierilor induse de PKC sunt de dorit îndeosebi în aplicațiile cosmetice. Întrucât extractul de cartilagiu a prezentat un efect antagonic evenimentelor celulare mediate de PKC și întrucât un astfel de efect antagonic este sugerat în domeniu ca fiind unul care îmbunătățește funcția de reparare a barierei pielii, se prezintă și o metodă pentru îmbunătățirea funcției de reparare a barierei pielii umane, care cuprinde etapa de aplicare pe piele a unei compoziții care cuprinde extractul de cartilagiu și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic, și la o astfel de compoziție. Alte compoziții, sau compoziții similare, pot fi concepute pentru a fi utilizate în cadrul unei metode pentru calmarea pielii sau pentru reducerea inflamațiilor pielii mamare. Inflamațiile pot fi determinate de către diverși agenți, cum ar fi iritanți chimici, abraziune fizică sau expunere la radiație ultravioletă. Sunt luate în considerare de asemenea compoziții și metode pentru inhibarea colagenazei în cazul pielii. Colagenaza și inflamarea sunt legate de îmbătrânirea prematură (degradarea collagenului) și prin urmare activitățile antagonice recuperate în extractul de cartilagiu ar putea fi puse să își aducă contribuția în compoziții și metode pentru întârzierea îmbătrânirii premature și pentru reglarea ridurilor sau a atrofiei pielii mamare. Printre cauzele ridurilor sau atrofiei sunt avute în vedere vârsta, expunerea la radiație ultravioletă sau la poluarea înconjurătoare. Compozițiile topice pot cuprinde o cantitate eficientă de cartilagiu de rechin, care urmează a fi stabilită pentru fiecare aplicație anume. În general, aceste compoziții pot conține între aproximativ 0,1 și 75% în greutate dintr-un extract lichid de cartilagiu concentrat 1:1 până la 20:1 și între aproximativ 50 și 99,9% în greutate dintr-un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic. Aceste compoziții pot conține un antioxidant, cum ar fi un agent care împiedică formarea de peroxizi de lipide în piele. Exemple ale unor astfel de antioxidanți sunt tocoferol, derivați ai tocoferolului, acid ascorbic, derivați ai acidului ascorbic și BHT. compozițiile pot fi suplementate cu agenți

antiinflamatori, cum ar fi un inhibitor al fosfolipazei A2 sau antiiritanți botanici ca extractul de ceai verde sau de cola. Compozițiile topice pot lua diverse forme, cum ar fi soluții, suspensii, loțiuni, tincturi, geluri, creme, spray-uri, emulsii, bare, unguente sau lipozomi (cel puțin o porțiune din extrasul lichid de cartilagiu fiind prezentă în lipozomi).

Procedeul descris, s-a dovedit a fi unul care asigură producerea de extracte de cartilagiu cu o mare valoare clinică. Extractele de cartilagiu de rechin produse prin acest procedeu nou cuprind o multitudine de activități care sunt recuperate cu randamente bune. Extractele de cartilagiu, cu precădere extractul lichid și fracțiunile acestuia, au un mare potențial întrucât ele nu sunt toxice pentru celulele normale dar sunt eficiente într-o mare varietate de boli și dereglări.

Materiale necesare

- instrumente chirurgicale
- tocător de carne
- pungi de plastic
- agitator industrial (agitator cu 3 viteze Waring, achiziționat de la Fisher Scientific)
- un sistem de purificare a apei (osmoza ianversă și filtrare 0,1 μm ; Continental Water System, model PRE 2202, nr.serie 91089, Modulab Bioscience RO/Publishing System, achiziționat de la Fisher Scientific, Montreal, Quebec). Acest sistem furnizează o apă apirogenă de bună calitate
- balanță de precizie Mettler, seria AE, achiziționată de la Fisher Scientific
- centrifugă Sorvall RC-285 achiziționată de la DuPont Canadas
- centrifugă CEPA
- saci din nylon cu porozitatea de 30 μM
- o autoclavă (sterilizator cu aburi automat Sanyo, model MAC 350P)
- containere Nalgene de 500 ml, sterilizate la 132°C timp de 10 min și uscate 35 min
- filtre conice cu porozitatea 24 μm Whatman Reeve Angel
- coloană de ultrafiltrare (valoarea de separare a greutatei moleculare: 500 kDa și 1 kDa când este cazul; suprafață: 2,3 m² (25 sq.ft); debit:130 l/min; presiunea de intrare: 30mpsi; presiunea de ieșire 5 psi; achiziționată de la Koch Membrane Systems Inc., Wilmington, MA, USA)
- pompa centrifugă sanitară (Monarch Industries, model ACE-S100, tip A) pentru asigurarea unui debit de 130 l/min
- hotă sterilă (hotă cu curgere laminară NuAire, achiziționată de la Ingram & Bell)
- filtre sterile Millipack-60 de 0,22 μm
- recipiente din sticlă clară sau translucidă, sterile
- concentrator DC-10 Amicon
- Rotofor Biorad 170-2950
- filtre Amicon SIOY10, SIOY30 și SIOY100 cu valori de separare de 10, 30 și respectiv 100 kD
- FPLC Pharmacia 216007 (computer Pharmacia 216014)
- Hilstand S-300 26 mm/60 cm (Pharmacia)
- Superose S-12 10 mm/30 cm (Pharmacia)
- liofilizator Labconco 10273 A.

Revendicări

1. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, pe bază de extract de cartilagiu de rechin, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 0,8%...1,75% extract de cartilagiu de rechin, 0,01%...5% antioxidant opțional 0,7%...10% agent inflamator, precum și un purtător acceptabil farmaceutic, procenteile fiind exprimate în greutate.

2. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** extractul este o fracțiune a supernatantului obținut după centrifugarea unui amestec omogen apos de cartilagiu de rechin integral, supernatantul fiind fracționat printr-o membrană cu o valoare moleculară a fracției de masă de 500 KDa, extract care conține 0,10...0,20% lipide, 8...25 mg/ml proteine, 97...99% umiditate, 30...220 mg% sodiu, 30...40 mg% potasiu, 2 mg% calciu, 1,1 mg% magneziu, urme de zinc și fier, și are acțiuni anticlagenolitice și antiinflamatoare. 1285
3. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizată prin aceea că** degenerarea sau boala este selectată dintre arterită, iritații ale pielii, inflamații ale pielii. 1290
4. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** inflamația pielii este cauzată de abraziune fizică. 1295
5. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** inflamația pielii este cauzată de un iritant chimic. 1300
6. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** inflamația pielii este cauzată de expunerea la radiația ultravioletă. 1305
7. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicărilor 1...6, **caracterizată prin aceea că** este o compoziție enterică.
8. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicărilor 1...7, **caracterizată prin aceea că** este o compoziție topică.
9. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicărilor 1...8, **caracterizată prin aceea că** antioxidantul este ales dintre tocoferol, derivați de tocoferol, acid ascorbic, hidroxitoluen butilat. 1310
10. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** agentul antiinflamator este un inhibitor al fosfolipazei A2. 1315
11. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** este o compoziție topică și agentul antiinflamator este un antiiritant derivat din plante.
12. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicării 11, **caracterizată prin aceea că** agentul antiinflamator este un antiinflamator ales dintre extract de cola și extract de ceai verde. 1320
13. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicărilor 8...12, **caracterizată prin aceea că** purtătorul acceptabil farmaceutic este ales dintre soluții, suspensii, loțiuni, tiincturi, geluri, creme, sprayuri, emulsii, creioane și unguente.
14. Compoziție pentru tratamentul unei dereglări, boli collagenolitice sau inflamatorii, conform revendicărilor 8...13, **caracterizată prin aceea că** extractul este conținut în lipozomi.

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**
 Examinator: **farm. Anghel Doina**

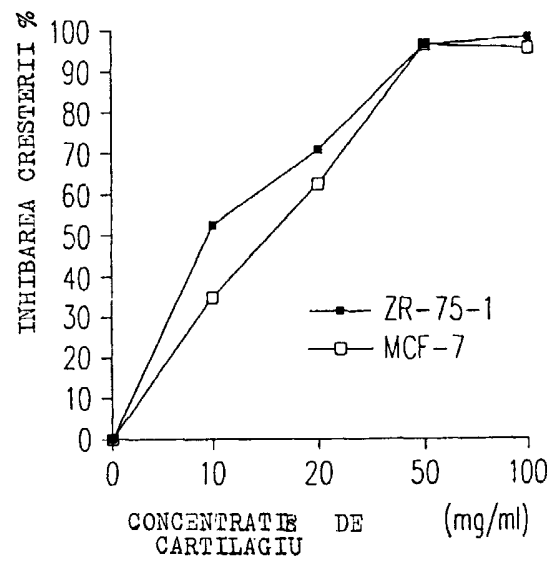


Fig. 1

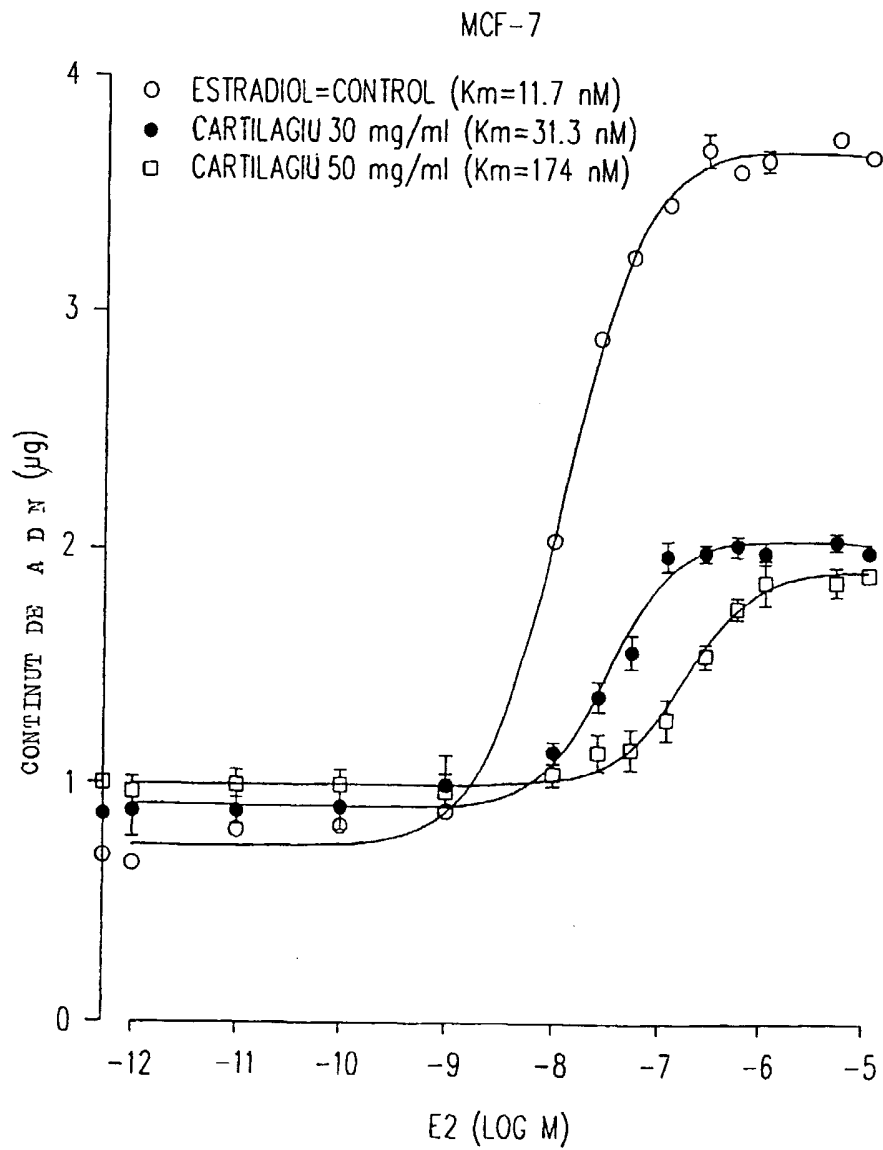


Fig. 2

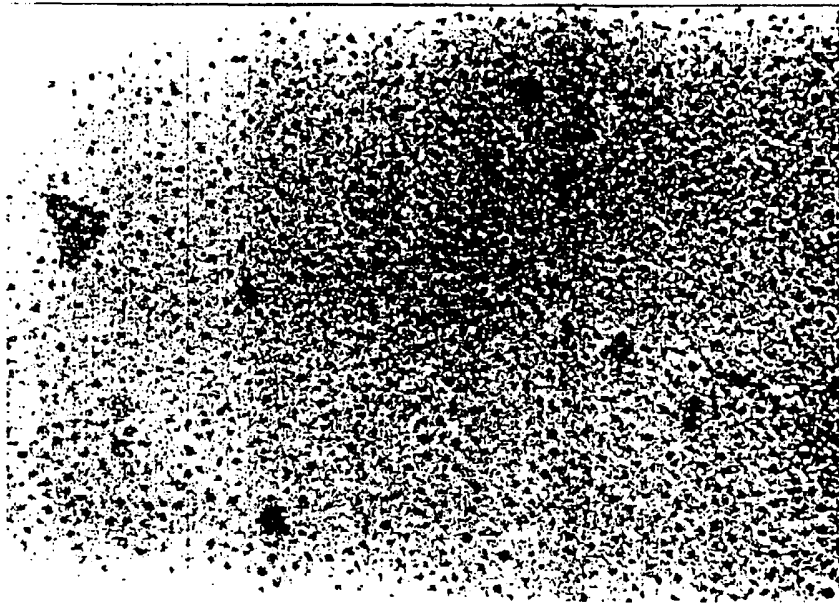


Fig. 3A

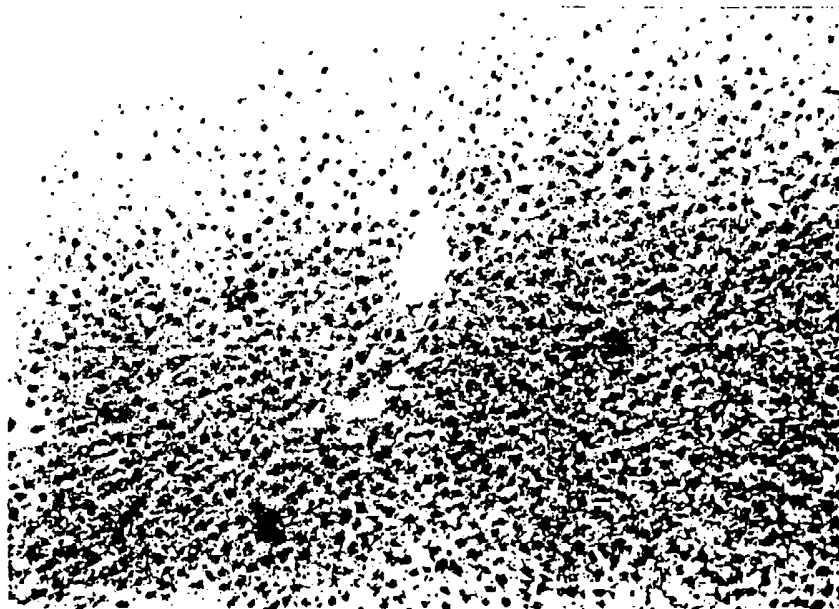


Fig. 3B

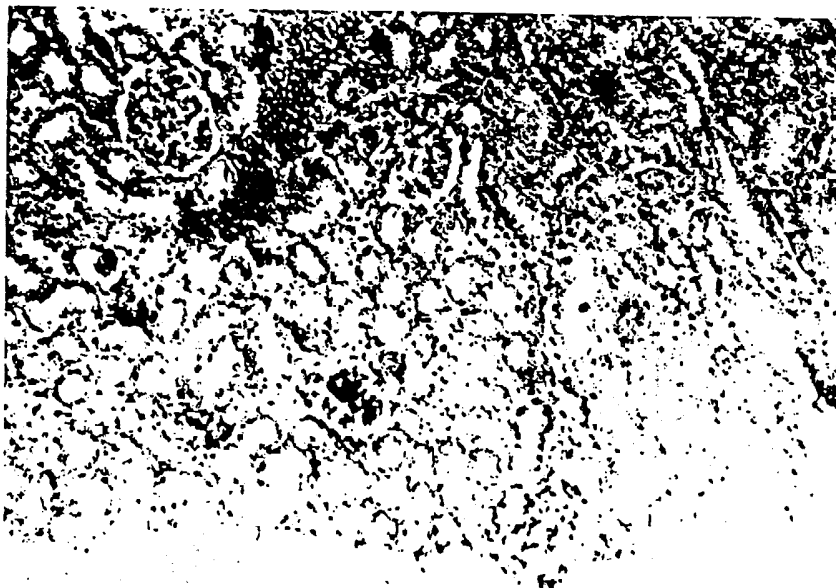


Fig. 4A



Fig. 4 B

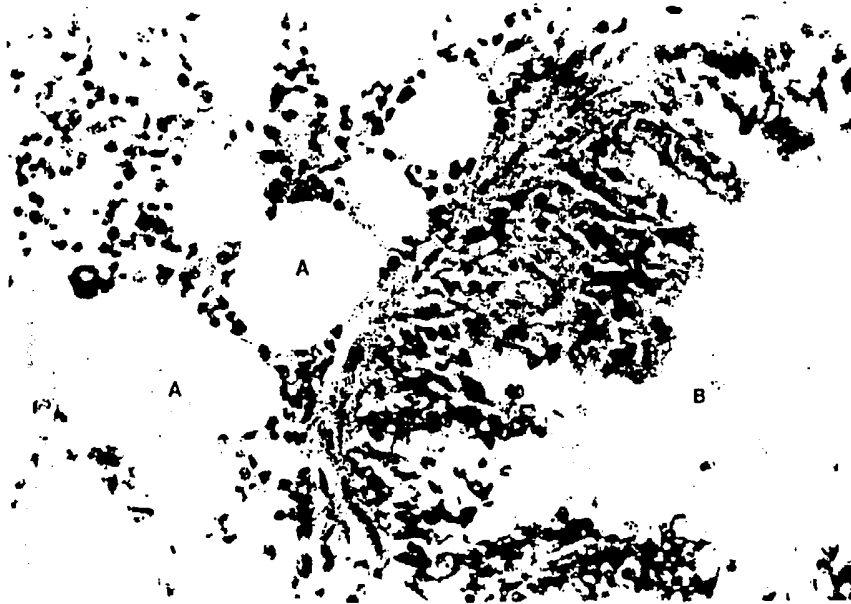


Fig. 5A



Fig. 5B

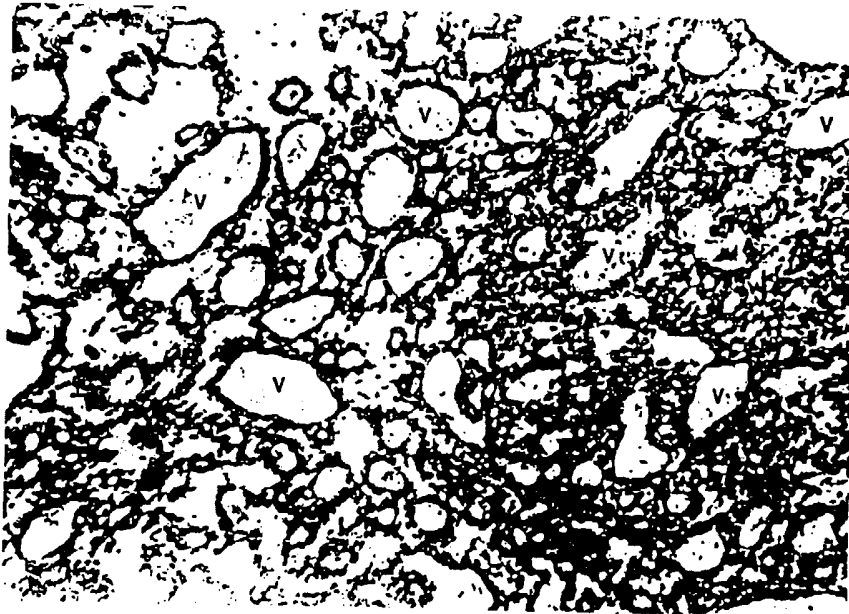


Fig. 6A



Fig. 6B

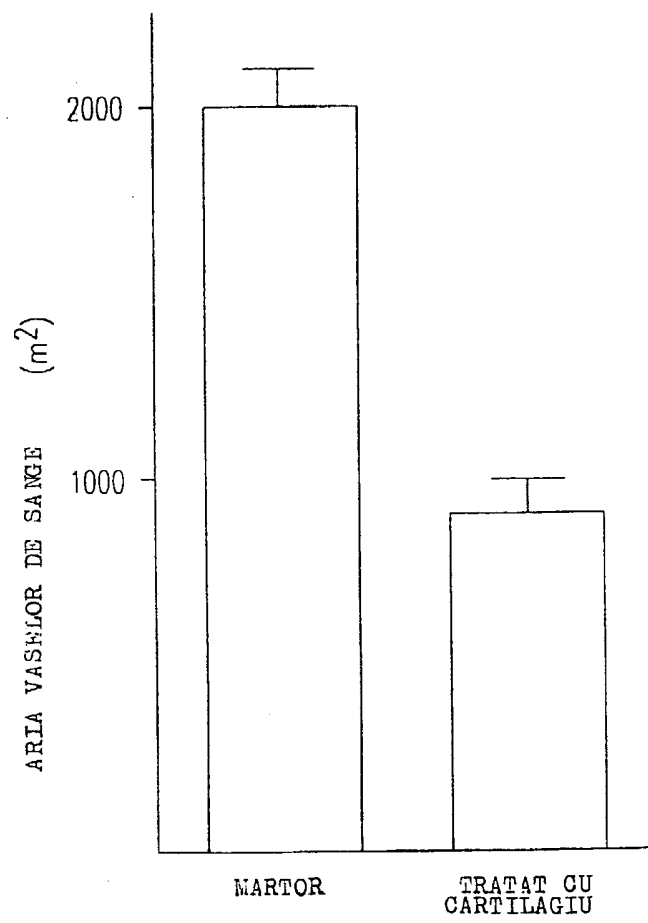


Fig. 7

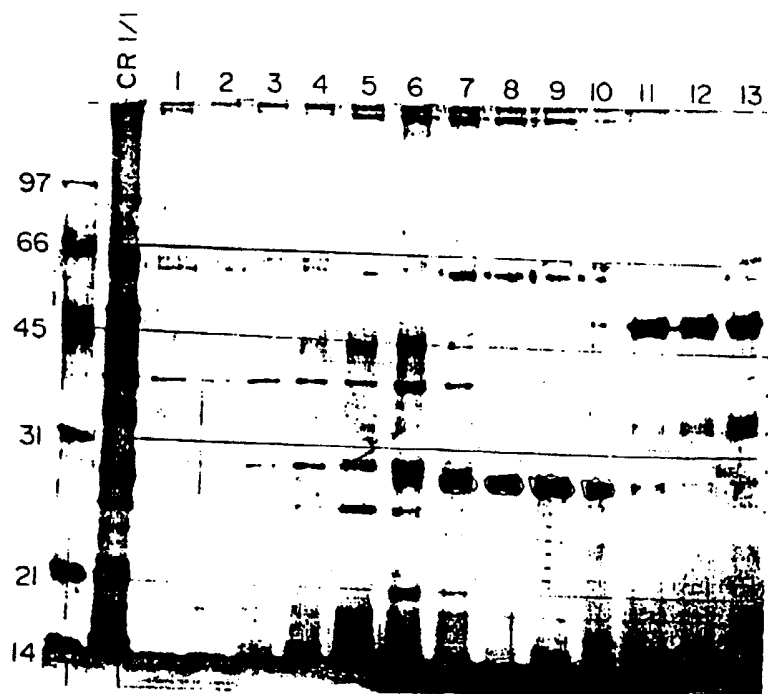


Fig. 8A

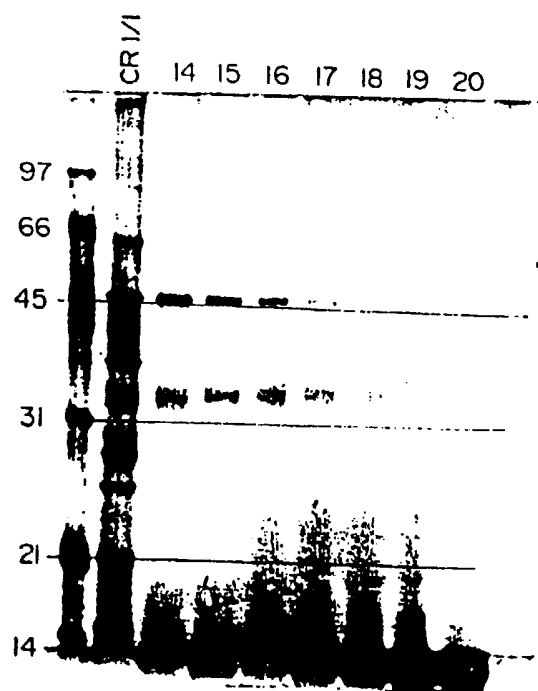


Fig. 8B



Fig. 9A

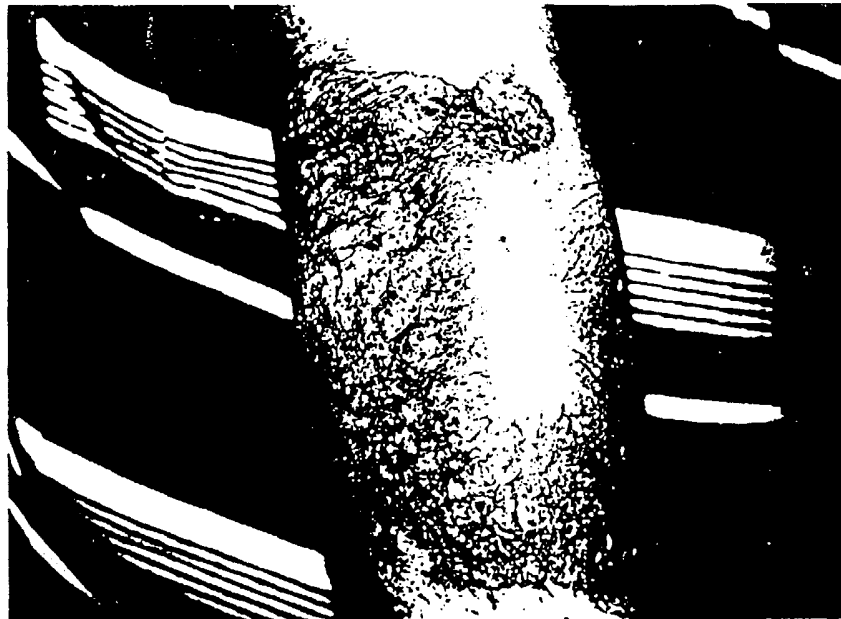


Fig. 9B



Fig. 9C



Fig. 9D

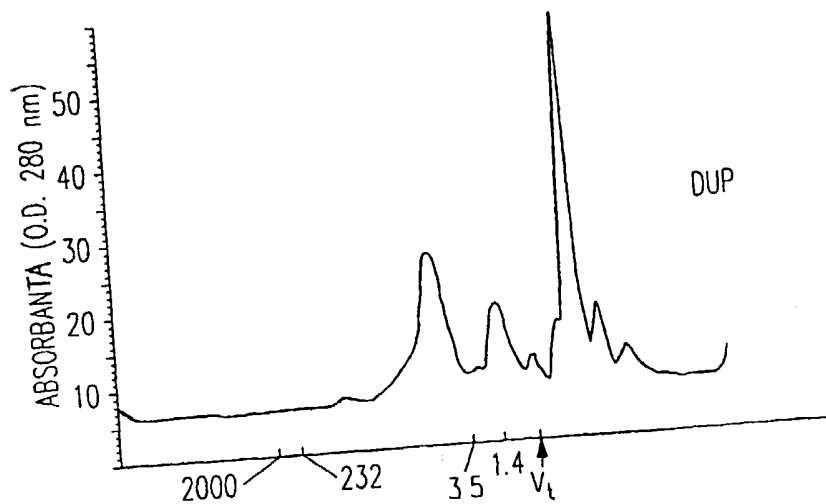


Fig. 10A

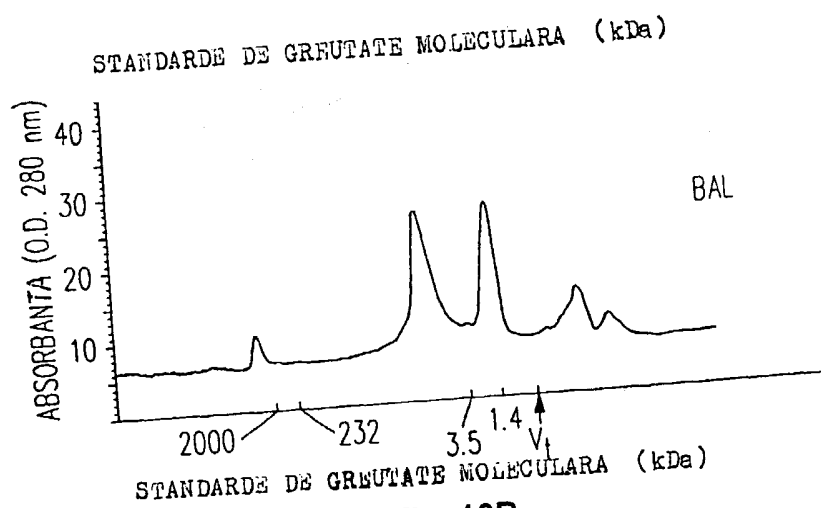


Fig. 10B

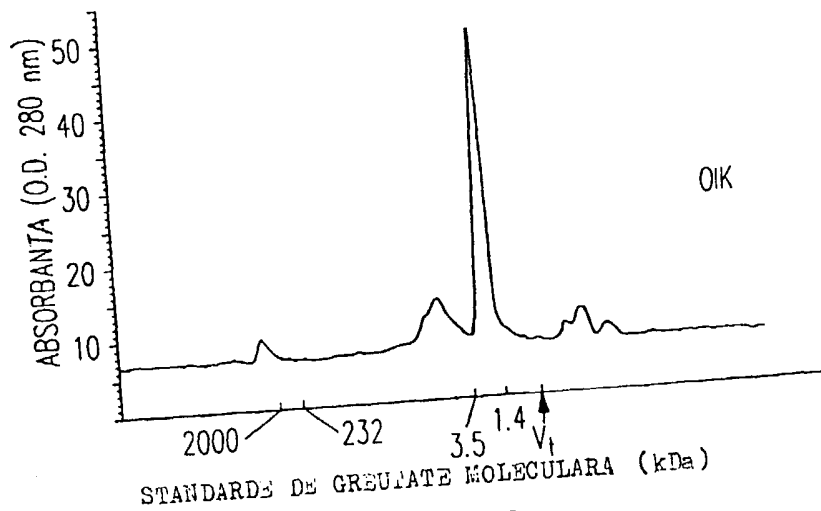


Fig. 10C

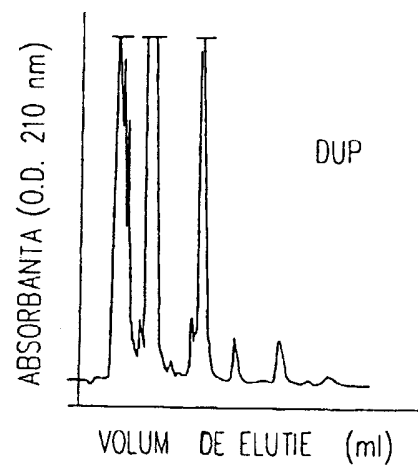


Fig. 11A

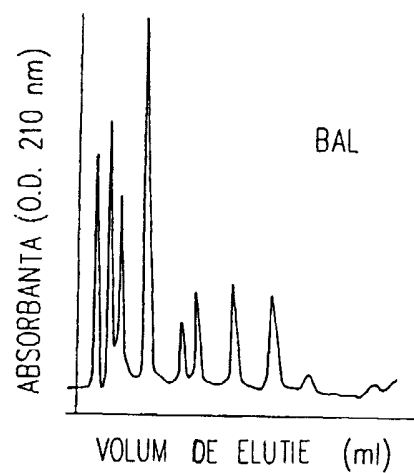


Fig. 11B

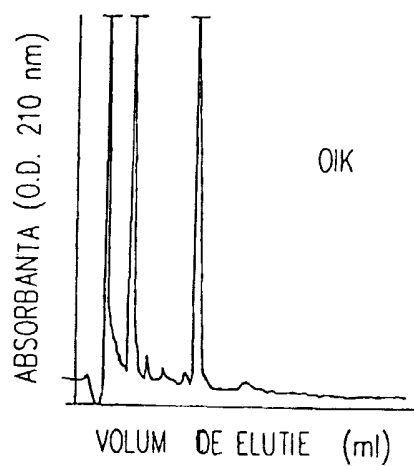


Fig. 11C

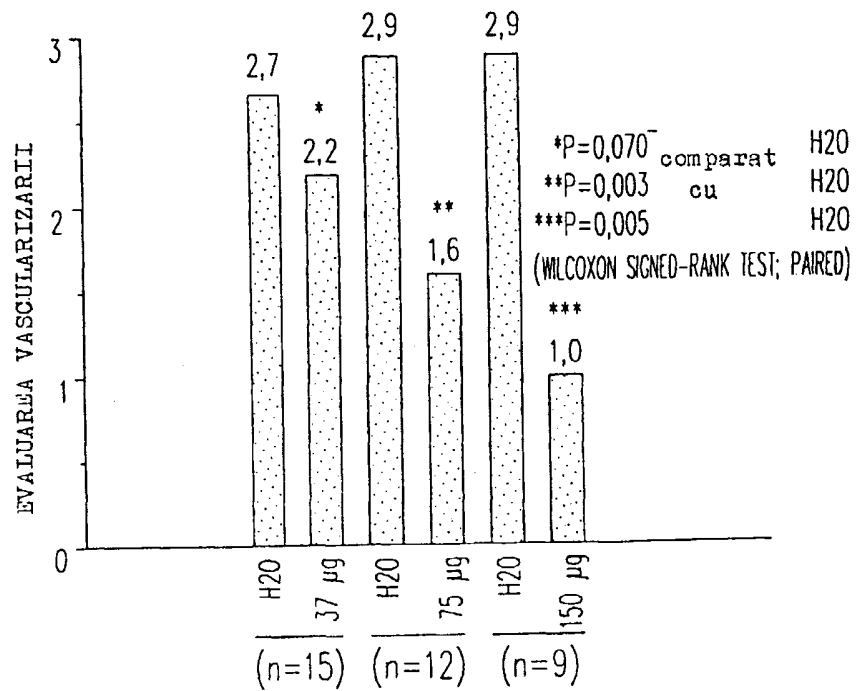


Fig. 12

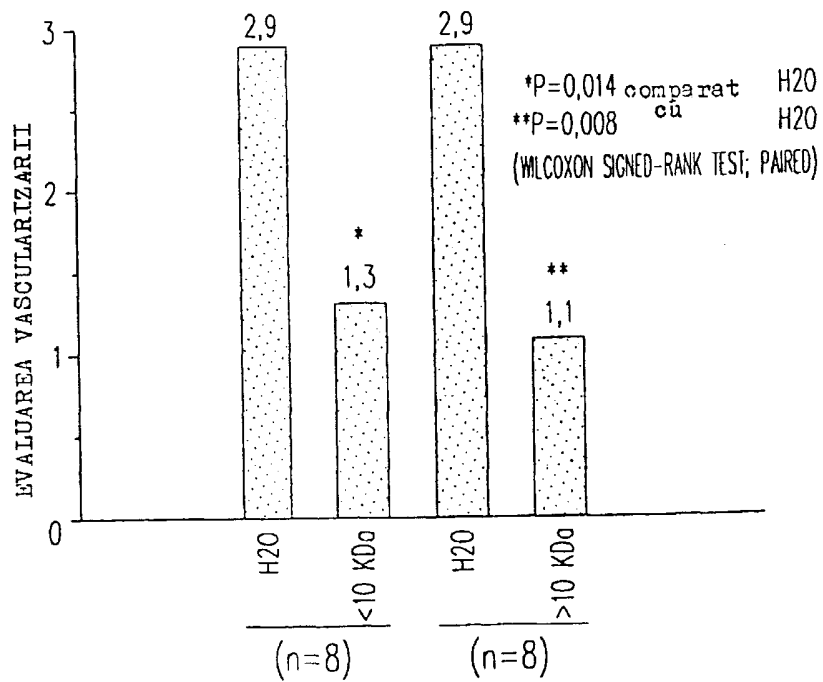


Fig. 13

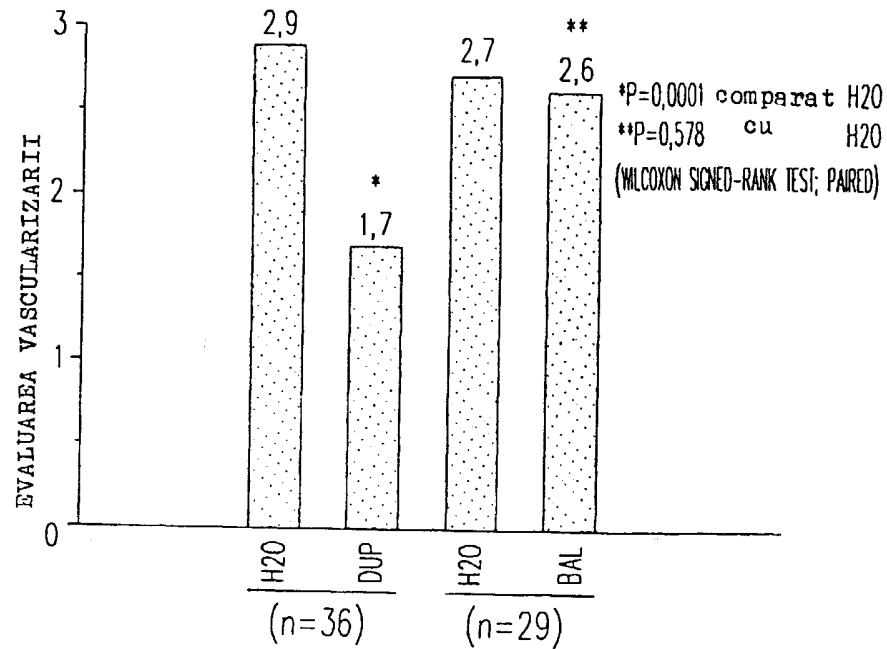


Fig. 14

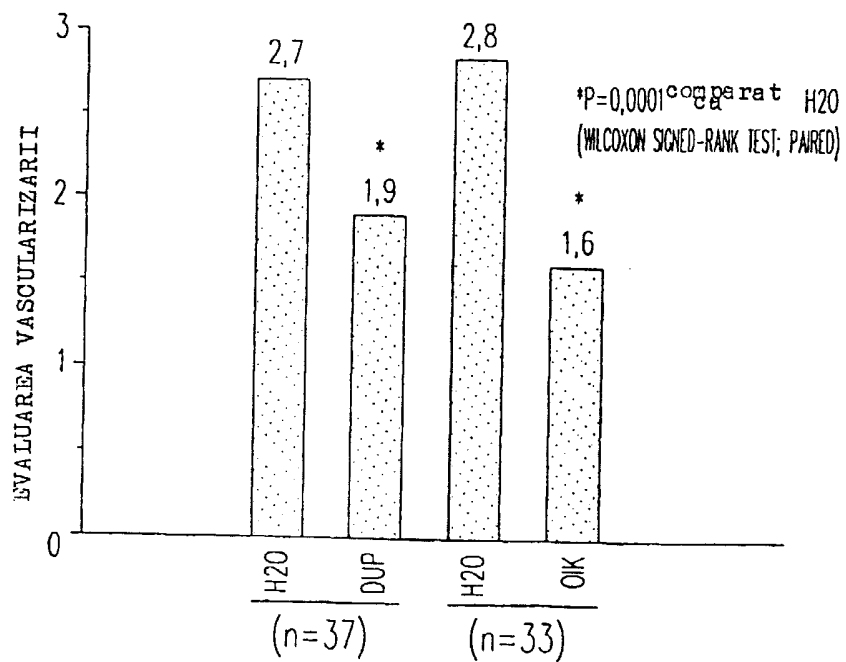


Fig. 15

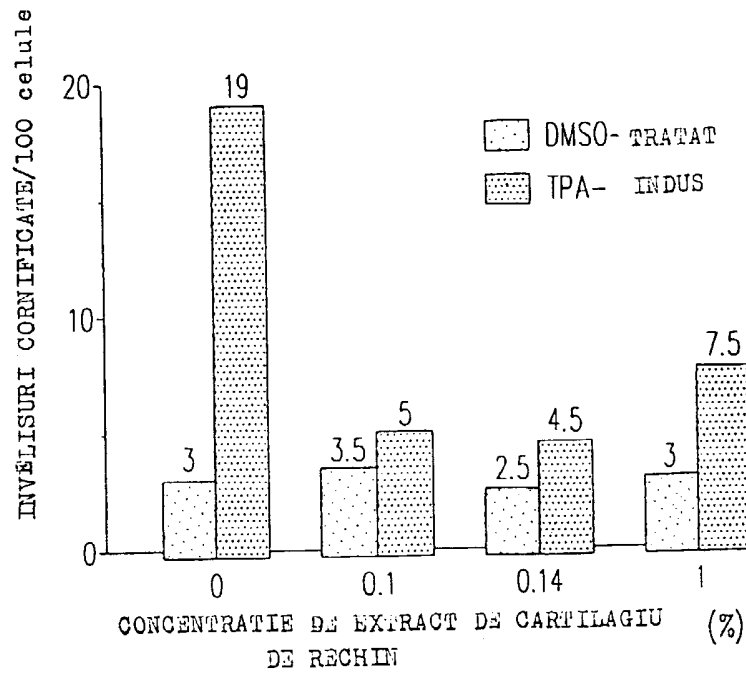


Fig. 16

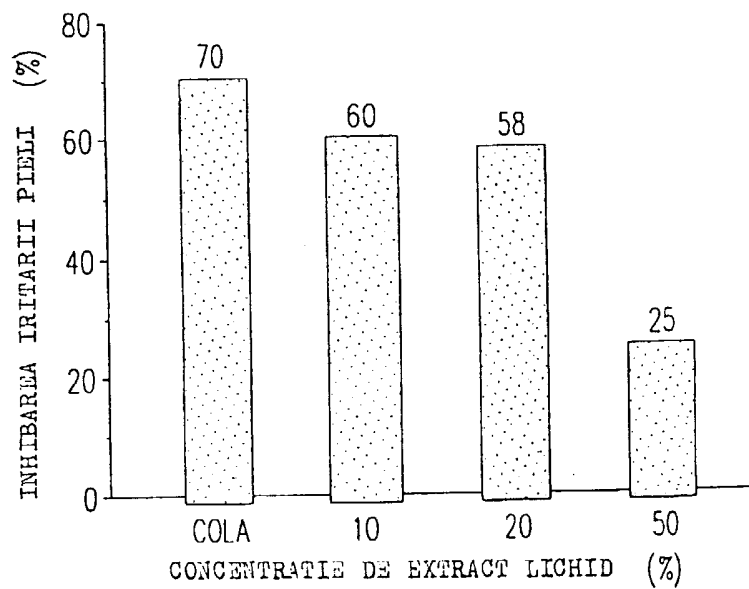


Fig. 17

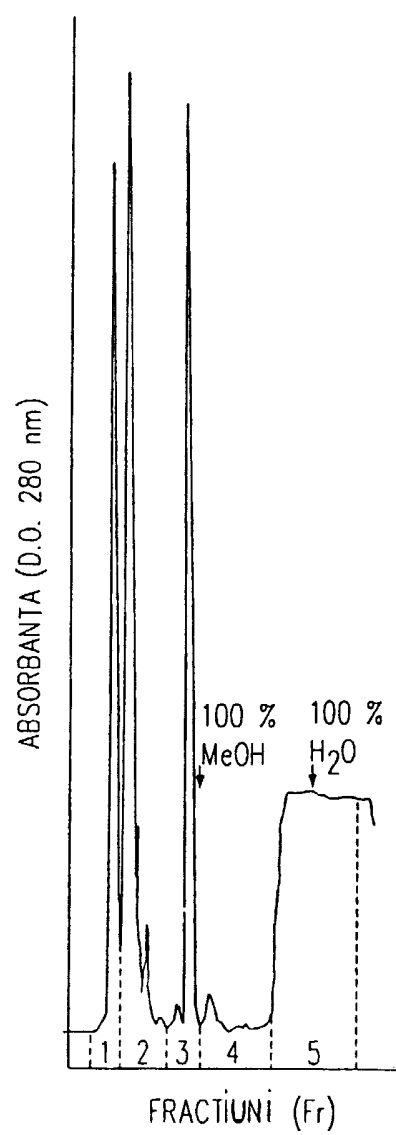


Fig. 18

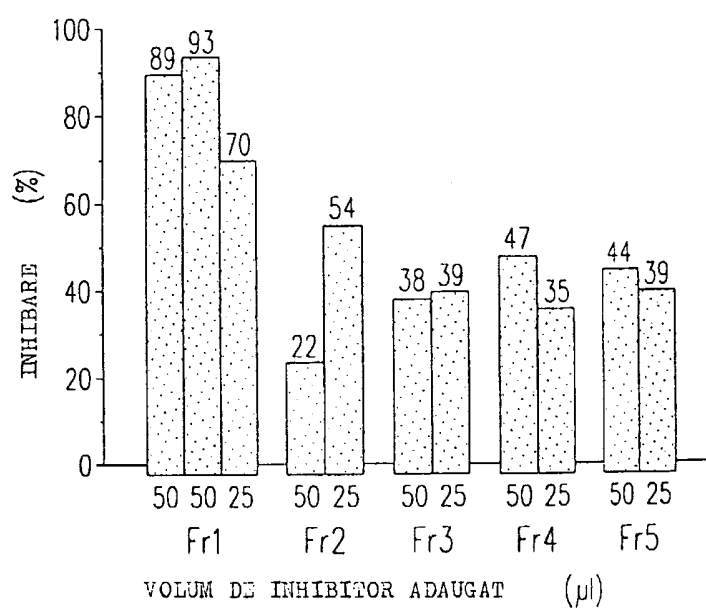


Fig. 19

