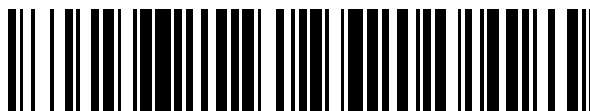


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 512**

51 Int. Cl.:
C12P 19/26 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07859586 .5**
96 Fecha de presentación: **06.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2046969**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR ÁCIDO HIALURÓNICO DE ELVADO PESO MOLECULAR.**

30 Prioridad:
06.07.2006 IN MU10652006
13.11.2006 IN MU18742006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
RELIANCE LIFE SCIENCES PVT., LTD.
DIRUBHAI AMBANI LIFE SCIENCES CENTER
PLOT NO. R-282, TTC AREA OF MIDC THANE
BELAPUR ROAD RABALE, NAVI
MUMBAI 400 701 MAHARASHTRA, IN

72 Inventor/es:
RANGASWAMY, Vidhya;
SANTOSH, Vyas;
DHARMENDRA, Jain;
NATARAJ, Vedapuri;
VELANKAR, Harshad y
KAPAT, Arnab

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 374 512 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir ácido hialurónico de elevado peso molecular.

CAMPO DE LA INVENCION.

5 La presente invención se refiere a técnicas mejoradas para preparar y purificar ácido hialurónico y su sal. La presente invención se refiere también a la producción y optimización del proceso, y a la purificación del ácido hialurónico y su sal, que tienen aplicaciones médicas.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION.

10 El ácido hialurónico (HA) es un biopolímero presente en la naturaleza que tiene funciones biológicas en bacterias y animales superiores, incluyendo las personas. El HA de origen natural puede encontrarse en el tejido de animales superiores, en particular como relleno del espacio intercelular. (Balazs, Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. J. Rheumatol. Suppl.; 39: 3 - 9, (Agosto 1993)). Se encuentra en las más altas concentraciones en el humor vítreo del ojo y en el líquido sinovial de las articulaciones. (O'Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., De Luca, C., y Lansing, M., Molecular mechanisms and genetics of hialuronano biosynthesis. International Journal of Biological Macromoléculas 16: 283-286 (1994)). En estreptococos gram-positivos, se ha encontrado como cápsula mucoide que rodea la bacteria.

15 El ácido hialurónico, llamado también hialuronano o hialuronato, es un glicosaminoglicano distribuido extensamente por los tejidos conjuntivo, epitelial y neuronal. Es uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Contribuye de manera significativa a la proliferación y a la migración de las células, y puede intervenir también en el progreso de algunos tumores malignos. El hialuronano se encuentra de forma natural en muchos tejidos del cuerpo, tales como piel, cartílago y humor vítreo. Es por tanto muy adecuado para aplicaciones médicas dirigidas a esos tejidos. El primer producto médico hialuronano, el Healon®, fue desarrollado en los años 70 y 80, y su uso fue aprobado para la cirugía ocular (es decir, trasplante de córnea, cirugía de cataratas, cirugía del glaucoma y cirugía reparadora del desprendimiento de retina). Otras compañías biomédicas producen también marcas de hialuronano para cirugía oftalmológica.

20 El hialuronano se usa también para tratar la osteoartritis de la rodilla. Tales tratamientos se administran como grupo de inyecciones en la articulación de la rodilla y pueden actuar para suplementar la viscosidad del líquido de la articulación lubricando de esta forma dicha articulación, amortiguándola y produciendo un efecto analgésico. El hialuronano puede tener también efectos bioquímicos positivos sobre las células del cartílago.

25 Debido a su elevada biocompatibilidad y su presencia común en la matriz extracelular de los tejidos, el hialuronano está ganando popularidad como biomaterial de andamiaje en la investigación de la ingeniería de tejidos. En algunos cánceres, los niveles de hialuronano se correlacionan bien con la malignidad y el mal pronóstico. El hialuronano puede ser usado como marcador tumoral para el cáncer de próstata y de mama. También puede ser usado para controlar el progreso de estas enfermedades.

30 El hialuronano puede usarse también postoperatoriamente para inducir la cicatrización de los tejidos, sobre todo después de la cirugía de cataratas. Los modelos actuales de cicatrización de heridas proponen que los polímeros mayores del ácido hialurónico aparecen en las primeras fases de la cicatrización para hacer espacio físicamente para los glóbulos blancos que median en la respuesta inmunitaria. El hialuronano es un ingrediente común en los productos para el cuidado de la piel.

35 El término "hialuronato" se refiere a la base de conjugado de ácido hialurónico (HA). Debido a que, in vivo, la molécula existe típicamente en su forma polianiónica, es más habitual denominarlo "hialuronano". El HA está formado por unidades de disacárido polianiónico lineal, no ramificado, que consisten en ácido glucurónico (GlcUA) una N-acetil glucosamina (GlcNAc) unida alternativamente por enlaces glicosídicos beta 1-3 y beta 1-4, como se muestra en la Figura 1. El HA es un miembro de la familia del glicosaminoglicano, que incluye sulfato de condroitina, sulfato de dermatina y sulfato de heparano. A diferencia de otros miembros de esta familia, no se une covalentemente a las proteínas.

40 En una solución acuosa neutra, debido a la formación de enlaces de hidrógeno, las moléculas de agua y los grupos carboxilo y N-acetilo adyacentes confieren una rigidez conformacional al polímero, lo que limita su flexibilidad. La formación de enlaces de hidrógeno tiene por resultado una capacidad de unión y retención de agua del polímero que resulta única. También se desprende que la capacidad ligante de agua está relacionada directamente con el peso molecular de la molécula. Se sabe que pueden unirse hasta seis litros de agua por gramo de HA (Sutherland, Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol* 16: 41 - 46, 1998).

45 El ácido hialurónico (HA) y sus derivados han sido ampliamente estudiados en cuanto a sus aplicaciones en prácticas biomédicas. La característica de biocompatibilidad de este polímero ha llamado la atención en ortopedia ya que puede usarse en viscoscirugía y permite a los cirujanos crear con seguridad espacio entre tejidos. Los implantes viscoquirúrgicos se construyen de HA (Balazs, August 1993, id.). El carácter viscoelástico del HA ha sido usado para suplementar la lubricación en articulaciones artríticas. También se ha usado para el suministro como microcápsulas

de fármacos direccionados. Finalmente, a causa de su elevada capacidad de retención de agua, este EPS (polisacárido extracelular) ocupa también un lugar en el provechoso mercado de los cosméticos. En 2003 el organismo FDA aprobó las inyecciones de hialuronano para rellenar defectos de tejido blando tales como las arrugas faciales. El Restylane® es un nombre comercial común para el producto. Las inyecciones de hialuronano suavizan temporalmente las arrugas añadiendo volumen bajo la piel, durando los efectos típicamente seis meses. Además, las soluciones de HA son característicamente viscoelásticas y pseudoplásticas. Estas características se encuentran en soluciones muy diluidas de este polímero, en las que se forman geles muy viscosos. La propiedad viscoelástica de las soluciones de HA, que es importante para su uso como biomaterial, es controlada por la concentración y el peso molecular del HA. El peso molecular del HA procedente de distintas fuentes es muy variable y está en el intervalo de 10^4 a 10^7 Da. La extrusión del HA a través de la membrana de la célula tal como se produce permite el alargamiento del polímero sin restricciones, lo que puede tener por resultado un peso molecular del HA muy alto.

El peso molecular es un parámetro que es el que más afecta a las propiedades físicas de los dispositivos médicos basados en el ácido hialurónico. El peso molecular influye sobre los perfiles de la viscosidad frente a la concentración de las soluciones de ácido hialurónico, y desempeña un papel fundamental en sus otras propiedades viscoelásticas. En particular, las soluciones que requieren una viscosidad dada para su eficacia terapéutica, requieren concentraciones más bajas de ácido hialurónico si aumenta el peso molecular. Se ha demostrado que esto proporciona ventajas tanto en las aplicaciones oftalmológicas como en las ortopédicas. Por tanto, un proceso que es capaz de generar ácido hialurónico de calidad médica, que tiene un peso molecular mayor que 750.000 daltons, tiene un importante potencial comercial. En muchas aplicaciones farmacéuticas, no es deseable tener ácido hialurónico de bajo peso molecular en la formulación, por ejemplo teniendo en cuenta los efectos inflamatorios del HA de bajo peso molecular, como se publica en la patente de EE.UU. nº 4.141.973.

El ácido hialurónico se usa en productos comerciales de gran venta, entre los que se incluyen Synvisc (Genzyme), Orthovisc (Anika), Septrafilm (Genzyme), Restylane (Q-Med), Healon (Pharmacia), Amvisc (Med-Chem), etc. Debido a su elevado coste, sin embargo, se usa solamente en concentraciones muy pequeñas en estos productos. El HA tiene un valor comercial mayor que otros EPS microbianos. Con un valor estimado en el mercado de 500 millones de dólares USA, se vende a aproximadamente 100.000 dólares el kilogramo.

El HA se ha extraído convencionalmente de las crestas de gallo y del humor vítreo bovino. Sin embargo, es difícil aislar HA de alto peso molecular a tasas industrialmente viables a partir de estas fuentes, porque forma un complejo con los proteoglicanos presentes en el tejido animal (O'Regan et al., 1994). Actualmente no es práctico controlar el peso molecular del biopolímero cuando se sintetiza en el tejido animal. Además, el uso de productos bioquímicos derivados de animales para terapias en personas tiene problemas éticos mayores, y se encuentra con una resistencia creciente. Además de los problemas éticos, hay un riesgo potencial de enfermedades infecciosas asociado con el uso de productos bioquímicos derivados de animales para terapias en personas. Dado que podrían obtenerse del tejido animal cadenas de 10 MDa, hay considerables perspectivas de mejora.

Los inconvenientes discutidos anteriormente han obligado a la industria a adoptar procesos de fermentación bacteriana con la esperanza de obtener biopolímeros comercialmente viables. Usando un proceso de fermentación bacteriana, se libera HA en el medio de cultivo, lo que ayuda a controlar las características del polímero y tiene por resultado rendimientos de HA mejorados. La cantidad de biopolímero que puede producirse por la vía anterior es teóricamente ilimitada. Sin embargo, el uso de la fermentación bacteriana tiene inconvenientes. La tendencia reciente es usar estreptococos grupo A y C de Lancefield, que producen de forma natural una cápsula mucoide de HA. La cápsula de HA es un factor de biocompatibilidad que permite que estas bacterias gram positivas evadan las defensas inmunitarias del hospedador por su nivel de virulencia característicamente elevado.

Mejoras previas subsiguientes en los procesos de extracción y purificación usando bacterias han tenido por resultado una reducción inherente del peso molecular del HA. Las fermentaciones estreptocócicas han podido producir solamente HA con un peso molecular medio en el intervalo de 1 a 4 MDa. Como se discutió anteriormente, un peso molecular elevado es una propiedad deseable del biopolímero de HA. La presente invención proporciona métodos para obtener HA que tiene un peso molecular elevado.

Los estreptococos son nutricionalmente fastidiosos, anaerobios facultativos, que producen ácido láctico como subproducto del catabolismo de la glucosa. Por ello la energía recuperada por estas bacterias es inferior en relación con las bacterias aerobias. El rendimiento de HA a partir de la fermentación bacteriana obtenida usando métodos anteriormente conocidos es característicamente bajo (0,1 g/g glucosa, 0,15 g/lh). Tales bajos rendimientos ciertamente luchan por satisfacer la demanda del mercado. Además, los requisitos nutricionales estrictos para la fermentación influyen sobre la economía vetando el uso de medios definidos químicamente para la producción de fermentaciones a escala, y limitan la elección de medios complejos que pueden ser empleados.

Varios grupos han propuesto la optimización de los parámetros del proceso, la selección del modo de proceso de HA, optimización del rendimiento mediante el diseño del medio complejo, y el control de fermentación basado en modelos de HA. Cooney, M. J., Goh, L. T., Lee, P. L., y Johns, R. R., Structure model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth, *Biotechnology Progress*, 15: 898 - 910 (1999); Lars M. Blank, Richard L.

McLaughlin, Lars K. Nielsen, Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate, *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (6): 685 - 693 (2005); Johns, M. R., Goh, L.-T., y Oeggerli, A., Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnology Letters* 16: 507 - 512 (1994); Kitchen, J. R., y Cysyk, R. L., Synthesis and release of hyaluronic acid by Swiss 3T3 fibroblasts, *Biochemical Journal*, 309: 649 - 656 (1995); Armstrong D, Johns M R, Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2759 - 2764 (1997).

Con el tiempo, el peso molecular del HA se ha convertido en una importante área de estudio para los investigadores. Investigadores tales como Armstrong y Johns han examinado el efecto de los parámetros de proceso para establecer el efecto sobre el peso molecular del HA. Armstrong, D. C., y Johns, M. R., Effect of Culture Conditions on Molecular Weight of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2759-2764 (1997); Armstrong, D. C., y Johns, M. R., Improved molecular weight analysis of streptococcal hyaluronic acid by size exclusion chromatography, *Biotechnology Techniques*, 9: 491 - 496 (1995).

Estos grupos han encontrado que ciertos parámetros de fermentación afectan al peso molecular del HA producido. Armstrong et al (1997) publicaron que condiciones tales como la temperatura, la aireación y la concentración de glucosa afectan al peso molecular del HA, mientras que el pH y la agitación no lo hacen. Se encontró que bajas temperaturas de crecimiento (28° C), la aireación del cultivo y una concentración inicial de glucosa alta (40 g/l) daban lugar a la producción de un HA de peso molecular más alto en *S. zooepidemicus*. Otros grupos anteriores encontraron también que el pH del cultivo y la agitación no afectaban al resultado del peso molecular de las fermentaciones de HA. Específicamente, Johns et al. (1994) publicaron anteriormente que el pH y la agitación afectaban a la producción de HA de un modo general, pero no al peso molecular.

Ya se conoce el hecho de que la velocidad de crecimiento específico de las bacterias y el peso molecular del HA son inversamente proporcionales. Este efecto puede explicarse por un modelo metabólico basado en los recursos para la síntesis del HA, como se ilustra en la Figura 1. En su forma más simplista, tienen lugar dos procesos competidores dentro de una célula bacteriana, como son el crecimiento de la célula y la biosíntesis del HA. Estos dos procesos compiten por los recursos limitados, tales como el carbono, el nitrógeno y la energía. A velocidades de crecimiento específico bajas, la célula dirige más precursores activados derivados de la glucosa (a saber, UDP-Glc y UDP-GlcNAc) a la síntesis de HA en vez de hacerlo a la síntesis de la pared de la célula. El rendimiento de ATP más alto a partir del catabolismo aerobio de la glucosa favorece la formación de UTP, que se requiere para la formación de los dos precursores activados de la síntesis de HA, a saber UDP-GlcUA y UDP-GlcNAc. La glucosa, que puede usarse para sintetizar el HA, se gasta también por la producción de lactato bajo crecimiento anaerobio.

También se había observado con anterioridad que la velocidad específica de producción de HA ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) aumenta al disminuir la velocidad de crecimiento específico. Dado el hecho de que la densidad de las enzimas de síntesis de HA activas es improbable que cambie, el aumento de la velocidad de producción puede atribuirse a una más alta actividad de polimerización por cada sintasa. Una actividad de sintasa aumentada puede surgir del aumento de concentración de sustrato intracelular que resulta de la velocidad de crecimiento baja.

El peso molecular del HA producido está determinado por el número de precursores que la sintasa es capaz de polimerizar durante su tiempo de vida. Basándose en esta teoría, la sobreexpresión de la sintasa tiene por resultado la disminución del peso molecular del HA sintetizado. En realidad puede reducir el peso molecular medio porque hay más enzimas compitiendo preferentemente por los mismos recursos. Un efecto similar fue publicado para la sobreexpresión de polihidroxibutirato sintasa en *E. coli* recombinante. (Sim et al., PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo, *Nature Biotech.* 15: 63 - 67, 1997).

La patente de EE.UU. n° 4.897.349 demostró que podían obtenerse rendimientos globales de HA mejorados controlando el oxígeno disponible para el metabolismo por un microorganismo productor de ácido hialurónico. El oxígeno disponible se limitaba a estimular una producción desproporcionadamente mayor del ácido hialurónico deseado. Las condiciones de cultivo con respecto a la fuente de carbono no fueron estudiadas. Sin embargo, el proceso requirió la modificación del oxígeno disuelto, que normalmente no tuvo como resultado rendimientos consistentes de HA producido.

La patente europea EP 0694616 empleó una concentración de 2,5% de un cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* obtenido de una colección. La fermentación llevó aproximadamente 24 horas a 37° C, con un pH mantenido en 7,00 mediante la adición continua automática de NaOH. El 33% de la dextrosa se añadió en el momento de la inoculación, y el resto se administró de forma continuada. El rendimiento del proceso, determinado por medio de análisis de HPLC, fue tan bajo como 0,8 g/l con un peso molecular medio estimado en aproximadamente 500.000 Da.

La patente japonesa JP 62215397 demostró que un microorganismo capaz de producir ácido hialurónico era cultivado aeróbicamente en un medio bajo agitación, cuando se añadían sacáridos al medio varias veces, la concentración de sacáridos se mantenía siempre en 0,1 - 3 % p/v en el medio. El ácido hialurónico acumulado en el medio era recolectado. El sacárido preferido era glucosa o lactosa. El ácido hialurónico acumulado en la mezcla de

cultivo fue separado por un método convencional para la separación de polisacáridos. El proceso presentado en esta patente era un proceso por tandas y no aplicable a un proceso de tandas continuas.

5 La patente japonesa JP 62257901 describió un proceso para producir HA que pudo obtenerse cultivando bacterias productoras de ácido hialurónico en un medio que contiene carbohidratos (p. ej. con un pH 7,5, conteniendo 0,50% de extracto de levadura, 0,75% de peptona, 0,2% de sulfito sódico y 1 - 3% de glucosa).

10 La patente japonesa JP 62289198 presentaba un proceso en el que una cepa microbiana productora de ácido hialurónico, tal como *Streptococcus equi* NK-850214 era inoculada en un medio líquido que contiene arginina y/o ácido glutámico a una concentración de 0,01 - 1 % en peso, además de peptona, NaCl, vitaminas traza, etc., mediante un proceso de cultivo que comprende la adición de 20 g de carbohidratos, tales como glucosa, por litro de medio, en 3 o más dosis divididas de una manera que mantenía constantemente la concentración de carbohidratos en 0,1 - 3 % p/v a lo largo del cultivo.

En la patente japonesa JP 05276972, se cultivó un microorganismo capaz de producir ácido hialurónico en una solución de cultivo que contiene un agente tensioactivo. Se formó ácido hialurónico, que se acumuló en la solución de cultivo y se recogió.

15 La patente japonesa JP 06038783 proporcionó un proceso para producir ácido hialurónico en escala industrial cultivando una cepa microbiana productora de ácido hialurónico que pertenece al género *Streptococcus*, en un medio nutriente. El medio contenía una cantidad específica de un componente de azúcar (como fuente principal de carbono) bajo condiciones específicas, mientras se agita el medio mediante aireación. Una cepa microbiana que pertenece al género *Streptococcus* y que es capaz de producir ácido hialurónico (p. ej. *Streptococcus zoepidemicus*) fue inoculada en un medio nutriente que contiene 3% o más de componente de azúcar como fuente principal de carbono, y se cultivó a pH 7 y a 33° C durante 4 días bajo agitación por aireación. El rendimiento obtenido por este proceso era 2,1 g/L.

20 La patente japonesa JP 06319579 presentó la producción de ácido hialurónico en un medio que contiene glucosa y fructosa como principal fuente de carbono para acumular ácido hialurónico de alto peso molecular en la mezcla de cultivo.

25 La patente de EE.UU. n° 4.784.990 demostró un método para obtener hialuronato sódico que comprende cultivar con agitación vigorosa un microorganismo del género *Streptococcus* bajo condiciones apropiadas en un medio nutriente que contiene un componente de azúcar como fuente de carbono. El microorganismo produjo grandes cantidades de ácido hialurónico de alto peso molecular y esta patente se refiere a un método para seleccionar microorganismos que producen mayores cantidades de ácido hialurónico y que carecen de actividad hemolítica. *S. zoepidemicus* HA-116 ATCC 39920 que es una cepa mutante. El hialuronato sódico fue después recuperado eliminando el microorganismo y otros materiales insolubles en el medio, precipitando el hialuronato sódico del medio, p. ej. usando disolventes orgánicos, y recuperando el precipitado. El precipitado fue después molido y secado. Composiciones de hialuronato sódico caracterizadas por la ausencia de pirogenicidad y de actividad inflamatoria pudieron ser producidas por estos métodos. El medio tenía un pH sustancialmente constante entre aproximadamente 6,0 y 7,5, y el hialuronato sódico excretado al medio por el organismo fue purificado usando métodos que implican precipitación, redisolución y reprecipitación del hialuronato. El hialuronato sódico pudo ser precipitado del medio o filtrado añadiendo al medio un primer disolvente orgánico, tal como isopropanol. El precipitado se redisolvió en solución acuosa al 3% de acetato sódico y después se reprecipitó con un segundo disolvente orgánico tal como etanol. El segundo precipitado se redisolvió en una solución acuosa al 3% de acetato sódico y se añadió carbón activado para formar una suspensión. La suspensión y se añadió un tercer disolvente orgánico, p. ej. acetona, para producir un precipitado de hialuronato sódico. El primero, el segundo y el tercer disolventes orgánicos podían ser cada uno de ellos isopropanol, etanol o acetona. Alternativamente, podía precipitarse el hialuronato por el mismo disolvente orgánico en cada fase. Por ejemplo, el hialuronato sódico era precipitado del medio usando isopropanol en las tres etapas de precipitación. El proceso de esta patente para HA de calidad médica implicaba también el uso de detergentes tales como cloruro de cetil piridinio, etapas de precipitación con disolventes múltiples, así como tratamiento con florisil, etc.

30 La patente de EE.UU. n° 4.946.780 proporcionó un método para producir HA a partir de la fermentación empleando agentes tensioactivos tales como cloruro de cetil piridinio. El método implicaba también un procedimiento de purificación que comprende poner en contacto la solución que contiene hialuronato sódico con alúmina, carbón activado o mezclas de los mismos, y luego con sílice, para formar una solución purificada de hialuronato sódico. El método añadía después alcohol a la solución purificada de hialuronato sódico para precipitar hialuronato sódico purificado, y luego secaba el hialuronato sódico purificado. Los agentes tensioactivos son difíciles de eliminar del producto y necesitan múltiples etapas de lavado con agua libre de pirógenos.

35 La patente de EE.UU. n° 5.563.051 describió un proceso en el que, después del proceso de fermentación, la biomasa era matada con un agente particularmente adecuado. El agente usado para matar la biomasa era formaldehído, p. ej. en forma de la solución acuosa conocida comúnmente como formalina. El HA era extraído con un medio acuoso que contiene un agente tensioactivo aniónico, esto es, dodecil sulfato sódico. La patente describía además el uso de una membrana de ultrafiltración con un apropiado valor de corte de peso molecular, que

normalmente era de 10.000 a 25.000 Daltons, y preferentemente 20.000 Daltons. La solución filtrada que contiene el HA disuelto era diafiltrada con 8 a 20 volúmenes de agua purificada, preferentemente aproximadamente 10 volúmenes de agua purificada, en donde el filtrado era desechado continuamente.

5 La patente de EE.UU. n° 6.489.467 reivindicaba un procedimiento para purificar ácido hialurónico de alto peso molecular a partir de una fuente biológica, que incluye las etapas de ajustar el pH de una solución acuosa que contiene ácido hialurónico de alto peso molecular procedente de una fuente biológica a un pH en el intervalo de 1,7 a 3,3. El proceso implicaba además diafiltrar la solución acuosa al mismo pH usando un filtro que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 100.000 Daltons de valor de corte molecular nominal a 0,45 μm , y eliminar las células de la solución acuosa que contiene ácido hialurónico de alto peso molecular de la fuente biológica.

10 La patente de EE.UU. n° 7.002.007 describía métodos que implican poner en contacto una fuente que contiene hialuronato con un ácido para acidificar una suspensión de hialuronato, poner en contacto esa suspensión con un medio de intercambio aniónico en presencia de un tampón ácido, y a continuación poner en contacto el medio con un tampón ácido que tiene un mayor contenido de sal para desorber el hialuronato del medio.

15 El documento RU 2074863 describe un método para producir un ácido hialurónico, que incluye la fermentación aerobia de microorganismos en un medio de cultivo acuoso, y la separación por centrifugación y purificación cromatográfica con una resina de intercambio iónico.

Zhang et al. (Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 72, 168 – 172) describen un medio libre de suero para crecimiento de colonias y producción de ácido hialurónico por *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01.

20 El documento WO 86/04355 describe un método para producir hialuronato sódico de alto peso molecular por fermentación de *Streptococcus*.

25 Los métodos anteriores para producir HA usan normalmente glucosa como fuente de carbono. Usando estos métodos, se encontró con frecuencia que el peso molecular del HA obtenido estaba entre 2 y 4 $\times 10^5$ Da, esto es, un peso molecular relativamente bajo. Además, la viscosidad inherente del HA aumenta al aumentar su peso molecular. Este aumento de la viscosidad ha presentado un obstáculo importante durante la fermentación, así como en la purificación del HA. Aunque el HA de alto peso molecular puede ser demasiado grande para penetrar en la piel y el torrente sanguíneo, tiene cierto número de usos valiosos. In preparados tópicos, por ejemplo, el HA de alto peso molecular HA es útil en la cirugía de los ojos y en cosmética. Del mismo modo, el HA de alto peso molecular puede ser usado en una película viscoelástica para retener la humedad de la piel y bloquear sustancias extrañas.

30 Por consiguiente, se ha convertido en un reto y una necesidad proporcionar un procedimiento para producir HA de alto peso molecular, incluyendo el que satisface las especificaciones establecidas para aplicaciones médicas, p. ej. como se describe en la Farmacopea Británica, 2003.

35 Los anteriores métodos para purificar el HA han implicado al menos tres etapas sucesivas de precipitación en disolvente, resultando un mayor número de etapas de proceso y una sobrecarga en el liofilizador. Los métodos anteriores para precipitar el caldo de fermentación han implicado también el uso de agentes tensioactivos o detergentes, tales como cloruro de cetil piridinio/bromuro de hexadeciltrimetil amonio. La eliminación de detergente o agente tensioactivo residual hace que aumente el número de etapas de procesamiento que se necesitan, y ha planteado complejidad y costes.

40 Además, los procedimientos de purificación conocidos anteriormente, tales como las etapas de diafiltración empleadas para conseguir el HA de alto peso molecular, implican el uso de grandes volúmenes de disolvente orgánico. El uso de tal disolvente crea problemas de manipulación en las operaciones de escalado y tiene por resultado riesgos medioambientales.

45 La presente invención se refiere a mejoras en métodos para producir y purificar HA, tal como HA de alto peso molecular y su sal, incluyendo el que tiene aplicaciones médicas como en la Farmacopea Británica, 2003. La presente invención se dirige a un proceso simple y económicamente factible, para la producción de altos rendimientos de HA por fermentación continua de estreptococos tales como *Streptococcus zooepidemicus*, en un medio de cultivo adecuado, para producir elevados rendimientos de HA de alto peso molecular. El proceso de la presente invención tiene ventajas sobre el cultivo en tandas tradicional, en el que enzimas de degradación pueden comenzar a romper las paredes de las células de *Streptococcus*, y liberar el contenido de la célula en el caldo de fermentación, lo que lleva a dificultades en la purificación del HA. Además, el HA preparado de acuerdo con la presente invención puede ser purificado mediante un procedimiento que incluye filtración en gel de sílice combinada con un tratamiento con carbón activo y subsiguiente diafiltración usando menos cantidad de disolvente, dando así una mejor calidad de ácido hialurónico que tiene aplicaciones biomédicas. Del mismo modo, el HA preparado de acuerdo con la presente invención puede ser sometido a un procedimiento de purificación de ácido hialurónico y sus sales viable comercialmente, que tiene aplicaciones industriales.

OBJETO DE LA INVENCION.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir un ácido hialurónico que cumple las especificaciones establecidas para aplicaciones médicas en la Farmacopea.

Del mismo modo, es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento comercialmente viable para producir ácido hialurónico y su sal.

5 Es el objeto de la presente invención proporcionar un ácido hialurónico de alto peso molecular de calidad médica, producido por *S. zooepidemicus*.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un ácido hialurónico de alto peso molecular sin usar agentes tensioactivos o detergentes en el proceso de elaboración del HA.

10 Es el objeto de la presente invención optimizar el efecto de varias condiciones tales como fuente de carbono, ion metálico y composición del medio, sobre el peso molecular del HA, bajo la presente invención.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un ácido hialurónico de alto peso molecular de calidad médica.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento que está libre de agentes tensioactivos o detergentes.

15 Es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento en ciclo único para la purificación del ácido hialurónico.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento que comprende una cantidad mínima de disolventes.

Es también el objeto de la presente invención proporcionar HA de acuerdo con las especificaciones de la Farmacopea Británica 2003.

20 **SUMARIO DE LA INVENCION.**

La presente invención proporciona un procedimiento económico para producir ácido hialurónico de alto peso molecular y su sal. La presente invención proporciona una mejor calidad del ácido hialurónico que tiene aplicaciones biomédicas, libre de agentes tensioactivos o detergentes.

La presente invención comprende las siguientes etapas para la producción de ácido hialurónico de calidad médica.

25 a) Preparación de HA por fermentación.

b) Eliminación de las impurezas de proteína.

c) Diafiltración.

La presente invención utiliza la técnica de la fermentación para la producción de ácido hialurónico de alto peso molecular usando estreptococos, preferentemente la bacteria *Streptococcus zooepidemicus*.

30 La presente invención utiliza una fuente de carbono, ion metálico y composición del medio que optimizan la producción de HA de alto peso molecular, es decir, el medio nutriente comprende una sal de ion de zinc divalente, 1% de hidrolizado de caseína y 5% de una fuente de carbono elegida entre lactosa y sacarosa.

35 En una realización, el HA se prepara cultivando inicialmente el microorganismo *Streptococcus zooepidemicus* en un medio adecuado, seguido por la fermentación del caldo en un fermentador de 1 – 10 litros a aproximadamente 30 – 40°C, con agitación a aproximadamente 300 – 500 rpm y una aireación de 1 – 3 vvm (volumen/volumen/minuto) durante aproximadamente 15 – 28 horas, manteniendo el pH en un intervalo neutro (velocidad de aireación vvm = caudal volumétrico de gas por unidad de volumen de líquido y por minuto (volumen por volumen por minuto)). Después de la incubación, el caldo de fermentación se diluye adecuadamente con agua y se clarifica. El HA presente en el caldo clarificado se reprecipita con iguales volúmenes de disolvente adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a el mismo, el isopropanol. El HA de alto peso molecular precipitado se convierte después en su sal, pudiendo después ser solubilizado para el subsiguiente procedimiento de purificación. En una realización, el HA es convertido en su sal sódica mediante la adición de acetato sódico al 3%, y se homogeniza hasta la disolución completa.

45 En una realización, la presente invención proporciona condiciones de cultivo que optimizan el rendimiento y el peso molecular del HA. Se ha encontrado que la producción de HA es un fenómeno asociado al crecimiento. Se puede producir HA con peso molecular alto controlando las condiciones de cultivo. Por ejemplo, el peso molecular del HA producido aumenta con el crecimiento de las bacterias. Al comienzo del proceso de fermentación, la población de peso molecular más bajo (~ 5000 Da) es aproximadamente el 60% del HA total. Aproximadamente el 70% del HA total es de peso molecular alto (> 800 KDa) al término de 22 h de fermentación (Figura 4).

Además, el procedimiento de la presente invención usa una sal de ion zinc divalente en el proceso de fermentación del HA. Se sabe que los iones metálicos potencian la producción de la cápsula en varias bacterias. El efecto del CuSO_4 , MnSO_4 y ZnSO_4 al 0,025% (concentración final) fue ensayado sobre el rendimiento de HA al cabo de 24 h de fermentación. Aunque no hubo una diferencia significativa entre el testigo (sin adición de metal) y los matraces tratados con CuSO_4 o MnSO_4 , se encontró que una porción significativa (el 60%) del HA total en el medio tratado con ZnSO_4 estaba en la zona de peso molecular más alto (> 800 kDa) (Figura 5).

Del mismo modo, la fuente de carbono en el medio de cultivo, es decir el azúcar, puede ser lactosa o sacarosa. Se ensayó el crecimiento y la producción de HA en medios que contienen varios tipos de azúcares. Diferentes azúcares en el medio de cultivo afectaban al peso molecular del HA durante la producción. Aun cuando el crecimiento era bastante constante en la mayor parte de los azúcares (2% de concentración final), la lactosa y la sacarosa dieron mejor rendimiento de HA de alto peso molecular (> 800 K) comparando con la glucosa, que dio un HA peso molecular más bajo (Figura 6). El rendimiento de HA obtenido usando sacarosa fue al menos 10 veces mayor, y se encontró que el peso molecular del HA era mucho más alto, en comparación con la glucosa. Como se muestra en la Figura 6, el peso molecular del HA usando sacarosa mediante la presente invención era mayor que 8×10^5 Da (es decir 800 kDa), mientras que, en medio de glucosa, se encontró que el peso molecular estaba entre 2 y 4×10^5 Da (es decir 200 - 400 kDa).

Se examinó el efecto del medio sobre la producción de HA de peso molecular alto. En un experimento, se variaron el contenido de azúcar y de hidrolizado enzimático de caseína en el medio. En este experimento, el azúcar proporcionó la energía necesaria y el hidrolizado enzimático de caseína proporcionó la fuente de nitrógeno necesaria. La Figura 7 muestra los resultados cuando la concentración de azúcar aumentó del 2% al 5% y cuando la concentración de hidrolizado enzimático de caseína se bajó al 1% desde el 2,5% en el medio. Los parámetros proporcionaron un aumento del rendimiento de 5 - 6 g/L de HA (Figura 7). "Azúcar" en la Figura 7 se refiere a sacarosa; "biomasa" se refiere a la densidad de células, que refleja el crecimiento del microorganismo. El rendimiento fue menor cuando la concentración de azúcar era más baja (2%) y cuando la concentración de hidrolizado enzimático de caseína era más alta (2,5%), o cuando solamente se aumentó la concentración de azúcar al 5% (datos no mostrados).

En una realización, el HA se prepara mediante el cultivo inicial del microorganismo *Streptococcus zooepidemicus* en un medio adecuado y la subsiguiente fermentación del caldo en un fermentador de 1 - 10 Litros a aproximadamente 30 - 40°C, con agitación a aproximadamente 300 - 500 rpm y 1 - 3 vvm de aireación durante aproximadamente 15 - 28 horas manteniendo el pH en un intervalo neutro.

En una realización, el HA preparado de acuerdo con la invención es sometido a un eficaz proceso para la eliminación de las impurezas de proteína del ácido hialurónico. La presente invención emplea la filtración con gel de sílice y el tratamiento con carbón activo para la eficaz eliminación de las impurezas de proteína.

En una realización, el HA preparado de acuerdo con la presente invención es sometido a un eficaz proceso para la purificación del ácido hialurónico mediante diafiltración. La presente invención emplea una menor cantidad de disolvente en el proceso.

Después de la incubación, el caldo de fermentación se diluye adecuadamente con agua y se clarifica. El HA presente en el caldo clarificado se reprecipita con volúmenes iguales de disolvente adecuado, incluyendo, pero sin limitarse al mismo, isopropanol.

El HA de alto peso molecular precipitado se convierte después en su sal, siendo entonces solubilizado para el posterior procedimiento de purificación. La presente invención convierte el HA en su sal sódica mediante la adición de 3% de acetato sódico y se homogeniza hasta la disolución completa.

El HA preparado de acuerdo con la presente invención puede también ser purificado mediante un eficaz procedimiento de purificación que elimina las impurezas de proteína del ácido hialurónico. El procedimiento emplea filtración en gel de sílice y tratamiento con carbón activo para una eliminación eficiente de las impurezas de proteína. El tratamiento inicial con gel de sílice elimina aproximadamente el 68 - 70% de proteína. Después de eliminar el gel de sílice mediante centrifugación, el HA de alto peso molecular se trata con carbón activo, lo que elimina el 85 - 90% de la proteína. En una realización, el procedimiento implica hacer pasar la muestra de sílice tratada a través de carbón impregnado en un cartucho de celulosa.

En una realización, la solución obtenida después de eliminar las impurezas de proteína se purifica más intensamente mediante diafiltración. La presente invención emplea una menor cantidad de disolvente en el proceso. Por ejemplo, en una realización, la etapa de diafiltración implica la dilución de la solución de HA con el disolvente, es decir, agua libre de pirógenos, y la dilución se hace solamente 5 veces, en comparación con 10 veces, como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.489.467 (Carlino et al. (2002), Process for purifying high molecular weight hyaluronic acid) con lo que se reduce significativamente el volumen de manipulación. Puede usarse un modo continuo de diafiltración, que implica la dilución con agua estéril libre de pirógenos, por ejemplo cinco veces. En una realización, el proceso implica además aislar ácido hialurónico estéril purificado, mediante la filtración a través de un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro. En otra realización, el producto de hialuronato sódico para fines biomédicos puede obtenerse mediante filtración aseptica.

Opcionalmente, el hialuronato sódico puede ser reprecipitado con isopropanol para dar el HA de alto peso molecular purificado. El HA obtenido puede ser liofilizado hasta que el contenido de humedad es menor que el 5%.

5 En suma, el HA preparado de acuerdo con la presente invención puede ser sometido a un procedimiento de purificación para HA mejorado, que no emplea condiciones de pH ácido y que no usa detergentes ni agentes tensioactivos. La etapa de eliminación de las impurezas de proteína no emplea ningún producto químico peligroso, tal como la formalina. Además, el procedimiento de purificación emplea menos diluciones con disolvente y por tanto reduce la carga del liofilizador.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

10 Los dibujos que siguen forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar con mayor claridad ciertos aspectos de la presente descripción. Así pues, la invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones presentadas en el presente texto.

Figura 1: Muestra la unidad repetida de disacárido de HA que comprende GlcUA y GlcNAc.

Figura 2: Muestra ruta de biosíntesis de HA en *Streptococci*.

15 Figura 3: Ilustra el diagrama de flujo del proceso de preparación de ácido hialurónico de alto peso molecular de calidad médica.

Figura 4. Distribución de HA de varios pesos moleculares durante el crecimiento de *S. zooepidemicus*.

Figura 5. Efecto de iones metálicos sobre la población de HA de diversos pesos moleculares.

Figura 6. Perfil de HPLC de HA procedente de medios que contienen diferentes fuentes de carbono. El medio de cultivo fue suplementado con glucosa, sacarosa, lactosa o fructosa a una concentración final del 2%.

20 Figura 7. Optimización del medio para aumentar el rendimiento de HA. El contenido inicial de sacarosa era 5%, y la concentración de hidrolizado de caseína era 1,0%. El “%” corresponde a g/100 ml de medio; “azúcar” se refiere a sacarosa; y “biomasa” es la densidad de células que refleja el crecimiento del microorganismo. El hidrolizado enzimático de caseína actúa como fuente de nitrógeno durante el crecimiento de las bacterias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

25 La presente invención proporciona métodos para obtener un elevado rendimiento de HA de alto peso molecular de calidad médica, a partir de un caldo de fermentación bacteriana. La presente invención proporciona también métodos económicos para purificar HA.

Definiciones:

30 La expresión “ácido hialurónico” o “HA” como se usa en el presente texto indica ácido hialurónico obtenido a partir de cualquier fuente biológica.

El término “hialuronato” como se usa en el presente texto se refiere cualquier forma salina de HA, tal como la sal sódica de HA.

La expresión “alto peso molecular” como se usa en el presente texto se refiere a HA o a una sal de HA que tiene un peso molecular de al menos 1000 KDa (1 millón de Da) .

35 La expresión “gel de sílice” se refiere a una forma de sílice porosa granular obtenida sintéticamente a partir de silicato sódico de diversas porosidades. Un ejemplo es un gel de sílice comercializado por Ineos.

40 La expresión “carbón activo” significa un material con una superficie específica excepcionalmente elevada. Un solo gramo de carbón activado tiene una superficie específica de aproximadamente 500 m², que se determina típicamente por medio de la adsorción de gas nitrógeno, e incluye una abundante microporosidad. Un ejemplo es el comercializado por Millipore (Millistak +, minicápsulas de carbón activado M40AC23HH3).

45 La expresión “diafiltrar” o “diafiltración” se refiere a un procedimiento de filtración en flujo tangencial que permite la transferencia de especies de bajo peso molecular, agua y/o disolventes a través de una membrana, sin cambiar el volumen de la solución. Este procedimiento se usa para purificar especies retenidas de peso molecular grande, aumentar la recuperación de especies de peso molecular bajo, cambiar el tampón y simplemente cambiar las propiedades de una solución dada. Puede realizarse, por ejemplo, mediante el equipo de Sartoclon slice cassette mod. No. 3051465001E-SG, 50 kDa MWCO.

La expresión “pH neutro” significa que el pH es 7,0.

La fuente microbiana es una especie de *Streptococcus* capaz de producir ácido hialurónico de alto peso molecular. Por ejemplo, la fuente microbiana puede elegirse entre *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* y *Streptococcus pyogenes*.

5 El término "disolvente" usado en el presente texto indica cualquier disolvente orgánico o inorgánico. En una realización, el disolvente es isopropanol.

Como se señaló anteriormente, la producción de HA es un fenómeno asociado al crecimiento y está relacionada inversamente con el crecimiento. En una realización de la presente invención, los parámetros de cultivo y fermentación se seleccionan de forma que se equilibren estos dos procesos.

10 El peso molecular del HA aumenta con el tiempo en el cultivo, siendo detectadas las cadenas más pequeñas al principio de la fase de crecimiento y siendo detectado el HA de alto peso molecular durante la última parte del crecimiento. Estudios previos tales como los de Armstrong y Johns, han sugerido que la temperatura, el pH y la velocidad de agitación afectan drásticamente al peso molecular del HA cuando se produce HA en bacterias. Cuando se comparan los resultados con los del estudio llevado a cabo por Armstrong et al. (Armstrong y Johns, 1997) y otros procesos convencionales, otros investigadores encuentran que el pH del cultivo y la velocidad de agitación no afectan drásticamente al peso molecular del HA durante la producción.

15 En la presente invención, el uso de temperaturas y aireación más bajas, entre otros parámetros, puede mejorar el rendimiento de la producción de HA, y aumentar el peso molecular del HA que se produce.

20 Estudios previos encontraron que la concentración inicial de glucosa tenía un profundo efecto sobre el peso molecular del HA. Un grupo, Armstrong y Johns, ofreció una explicación, es decir que cuando los monómeros de azúcar activados UDP-GlcUA y UDP-GlcNAc estaban presentes a concentraciones elevadas, persistía el alargamiento de la cadena de HA. La concentración de glucosa externa pudo haber sido relacionada con las concentraciones internas de estos monómeros, porque eran derivadas de la glucosa y su síntesis requiere un consumo sustancial de energía. (Armstrong y Johns, 1997).

25 En la presente invención, sin embargo, los inventores han encontrado que la sacarosa y la lactosa son mejores fuentes de carbono que la glucosa para la producción de HA de alto peso molecular. Dado que la sacarosa y la lactosa son disacáridos, pueden servir como fuente de energía mejor que la glucosa. La presente invención proporciona que el crecimiento en sacarosa o lactosa a una concentración de 5%, e hidrolizado de caseína a una concentración del 1%, produce 5 - 6 g/L de HA de alto peso molecular. Se encontró que el peso molecular del HA estaba en el intervalo de $3,5 - 4,0 \times 10^6$ Da.

30 También ha sido estudiado el efecto de varios iones metálicos sobre el peso molecular del HA producido. Los iones metálicos presentes en el medio de cultivo son responsables del estrés oxidante contra las bacterias porque se están liberando radicales libres durante el proceso, que pueden tener un efecto bactericida. Para sortear este efecto, varias bacterias, en particular algunas especies de *Pseudomonas*, producen EPSs (polisacáridos extracelulares) tales como alginatos, etc., que ayudan a que las bacterias invadan el hospedador y sobrevivan así. Keith L M W, Bender C L. AlgT (ζ^{22}) Controls Alginate Production and Tolerance to Environmental Stress in *Pseudomonas syringae*, *J. Bacteriol.*, 181: 7176 - 7184 (1999).

35 Al menos un grupo ha sugerido que las hialuronato sintasas estreptocócicas y de mamíferos prefieren el ion magnesio a otros iones metálicos para la producción de HA de alto peso molecular. (Yamada y Kawasaki, Microbial synthesis of hialuronan and chitin: new approaches. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 521 - 528, 2005). Yamada T y Kawasaki, 2005 proporcionaron otro nuevo sistema de *Chlorella* -virus productor de HA estimulado por iones manganeso, que producía aproximadamente 0,5 - 1 g/L de HA. Los iones metálicos tales como Cu y Mn no inducen la producción de HA de alto peso molecular, aun cuando en la presente invención una población significativa de HA en el medio que contiene Zn estaba en el intervalo de alto peso molecular.

45 Para resumir, la presente invención ha optimizado las condiciones de cultivo lo que ha tenido como resultado la mejora del rendimiento, tal como 5 - 6 g HA/L, de HA de alto peso molecular. El hidrolizado enzimático de caseína está presente en una concentración de 1% y la concentración de azúcar es el 5% en el medio. Estas condiciones tienen por resultado una menor velocidad de crecimiento. Como la producción de HA es inversamente proporcional al crecimiento, se obtiene un aumento del rendimiento de HA. En una realización, el peso molecular del HA obtenido por medio de la presente invención es aproximadamente de $3,5 \times 10^6$ a $3,9 \times 10^6$ Da después de 24 h de fermentación.

50 En la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular o su sal, que tiene un peso molecular de al menos 1 millón de Da, en donde el procedimiento comprende: (a) proporcionar una bacteria de estreptococos capaz de producir HA; (b) proporcionar un medio nutriente que comprende una sal de ion Zn divalente (tal como $ZnSO_4$), 1% de hidrolizado de caseína, y 5% de una fuente de carbono elegida entre lactosa y sacarosa; (c) cultivar las bacterias en el medio nutriente; y (d) fermentar, tal como en una fermentación continua, el medio nutriente bajo condiciones aerobias. Las bacterias capaces de producir HA incluyen las seleccionadas en el grupo consistente en *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* y *Streptococcus pyogenes*.

El medio nutriente comprende 1% de hidrolizado de caseína y/o 5% de lactosa o sacarosa, y zinc, tal como en forma de ZnSO₄. En una realización, la etapa de fermentación se realiza durante al menos 15 horas a una temperatura de 30 - 40° C, una velocidad de agitación de 300 - 500 rpm, una aireación de 1 - 3 vvm, y un pH neutro.

5 En otra realización, el procedimiento produce un HA, o su sal, que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente $3,5 \times 10^6$ Da a $4,0 \times 10^6$ Da. En una realización, el proceso da al menos 5 g de HA de alto peso molecular por litro de medio nutriente. En una realización, el peso molecular del HA es al menos 3×10^6 Da después de 24 horas de fermentación.

10 El HA preparado de acuerdo con la presente invención puede ser sometido a un método para la eliminación de impurezas de proteína del HA producido, que comprende las dos etapas de tratamiento con gel de sílice seguido por el tratamiento con carbón activo. Una subsiguiente etapa de diafiltración contribuye también a asegurar una sal de HA altamente purificada. El producto así obtenido puede ser después filtrado asépticamente para aplicaciones biomédicas.

15 Los procedimientos de purificación conocidos con anterioridad precipitan el HA usando detergentes o agentes tensioactivos, tales como cloruro de cetil piridinio/bromuro de hexadeciltrimetil amonio. Sin embargo, esto requiere múltiples etapas para eliminar el detergente o agente tensioactivo residual. El HA preparado de acuerdo con la presente invención puede ser sometido a un eficaz método de purificación para el HA, que no emplea detergentes o agentes tensioactivos.

20 Los procedimientos conocidos con anterioridad para purificar el HA usando técnicas de diafiltración han implicado un número elevado de diluciones con disolvente, como es diluir 10 veces. Véase la patente de EE.UU. n° 6.489.467 (Carlino, et al., Process for purifying high molecular weight hyaluronic acid (2002)). El uso de grandes volúmenes de disolvente crea problemas durante la manipulación a escala mayor, tales como la necesidad de recipientes de tratamiento más grandes y tiempos más prolongados para completar el proceso, y, desde luego, mayor coste de producción. La presente invención evita tales problemas mediante el uso de menos diluciones.

25 En una realización, el HA preparado de acuerdo con la presente invención puede ser sometido a un procedimiento para purificar ácido hialurónico (HA) o su sal de un caldo de fermentación bacteriana, que comprende: (a) diluir y clarificar el caldo de fermentación; (b) precipitar el HA presente en el caldo con un volumen igual de un disolvente, tal como isopropanol, etanol o acetona; (c) disolver el HA precipitado o su sal en una solución, tal como acetato sódico al 3%; (d) añadir gel de sílice a la solución de HA o la solución de sal de HA de la etapa (c) y después eliminar el gel de sílice, por ejemplo mediante centrifugación; (e) tratar la solución de HA o la solución de sal de HA de la etapa (d) con carbón activo; y (f) diafiltrar la solución de HA o la solución de sal de HA de la etapa (e) usando un disolvente, tal como agua estéril libre de pirógenos, en aproximadamente cinco volúmenes; en donde el procedimiento se realiza en ausencia de cualquier detergente o agente tensioactivo o formalina, y a pH neutro.

35 En otra realización, el procedimiento comprende además convertir el HA precipitado en la etapa (b) en su sal, y entonces homogeneizar la sal de HA en la solución de la etapa (c). En otra realización, el carbón activo está impregnado en un cartucho de celulosa en la etapa (e). En otra realización, el procedimiento comprende además aislar HA estéril purificado o su sal mediante filtración a través de un filtro aséptico; y/o liofilizar el HA o su sal hasta que el contenido de humedad es menor que el 5%.

40 Los ejemplos que siguen se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para el buen funcionamiento en la puesta en práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para dicha puesta en práctica.

EJEMPLO 1: Cepa bacteriana y medios.

45 El *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* ATCC 39920 fue obtenido de la American Type Culture Collection. Las bacterias fueron mantenidas en agar con infusión de corazón cerebro o caldo de soja con Trypticase (triptopeptona de caseína y soja).

EJEMPLO 2: Estimación del HA.

El HA se estimó de forma rutinaria mediante el ensayo del carbazol (Bitter, T., y Muir, M., A modified uronic acid carbazole reaction. Anal Biochem 4: 330 - 334, 1962) en el caldo de fermentación después de la precipitación con un volumen igual de isopropanol y redisolviendo en solución de acetato de Na al 3%.

EJEMPLO 3: Optimización del medio.

50 Para los experimentos de optimización del medio, el *S. zoepidemicus* se cultivó en un medio constituido por 2,5% de hidrolizado enzimático de caseína, 1% de extracto de levadura, 0,2% de K₂HPO₄, 0,15% de NaCl, 0,04% de MgSO₄ · 7 H₂O y 2% de una fuente de carbono (sacarosa). El organismo se cultivó en matraces de Erlenmeyer a 37°C a 200 rpm durante 24 h. Para evaluar el efecto de los iones metálicos sobre la producción de HA, se añadieron

al medio soluciones de CuSO_4 , ZnSO_4 y MnSO_4 esterilizadas en filtro a la concentración final de 0,025%. Véase la Figura 5.

EJEMPLO 4: Determinación del peso molecular.

5 El peso molecular del HA se determinó mediante cromatografía de exclusión de tamaños en HPLC usando columnas Shodex OH-Pak SB805-804HQ conectadas en serie. La fase móvil usada fue NaNO_3 1 M a una velocidad de flujo de 1 ml/min y los picos se detectaron usando un detector R1. La columna fue calibrada con patrones de pululano de diversos pesos moleculares.

EJEMPLO 5: Removal of Impurezas de proteína.

Tratamiento con gel de sílice.

10 Una porción de la suspensión homogenizada, 100 ml, se trató en modo por tandas con gel de sílice al 2% de concentración final para la adsorción de proteína. Esta etapa elimina el 68 - 70% de proteína. El gel de sílice se separa de la solución de hialuronato sódico mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min a 4° C.

Tratamiento con carbón activo.

15 Se hizo un posterior tratamiento de la solución de ácido hialurónico de alto peso molecular con un conjunto filtrante de 0,45 μ con carbón adsorbido (Millipore, Millistak +, minicápsula de carbón activado M40AC23HH3). La velocidad de flujo era 14 ml/min. Esta etapa eliminó el 85 - 90% de la proteína que queda.

EJEMPLO 6: Purificación

Diafiltración en modo continuo.

20 La solución que pasa a través del filtro de carbón se purificó más intensamente usando un proceso de diafiltración en modo discontinuo. La solución diluida de HA fue bombeada (velocidad de flujo 15 ml - 20 ml/min) en un filtro de flujo tangencial o flujo cruzado equipado con una casete de poliéter sulfona con un valor de corte de 50 kDa (Sartocon slice cassette mod. No. 3051465001E-SG). Al iniciarse la alimentación del caldo acuoso al filtro, se cerró la válvula de permeado con el fin de recircular el caldo acuoso varias veces hasta que el sistema era estable y no se observaban burbujas en el retentado (solución retenida). La válvula de permeado se abrió al cabo de 10 min y el
25 caldo acuoso se recirculó el depósito de alimentación durante 10 min más, para asegurar que no había fugas de HA a través de la membrana por la válvula de permeado. Al cabo de 15 min se recogieron por separado el permeado y el retentado. Se añadieron de forma continua cinco volúmenes equivalentes de agua destilada estéril libre de pirógenos en el depósito que contiene solución de HA. Esta adición de agua a la solución de HA se hizo a la misma
30 velocidad de flujo que la velocidad de salida del filtrado. La presión de entrada del recipiente del filtro en flujo tangencial se mantuvo alrededor de 0,5 - 1,5 bares. El retentado se usó para una mayor recuperación de ácido hialurónico y el permeado se desechó. Esencialmente, el permeado no contenía HA. El retentado se concentró al volumen original y se analizó para determinar su pureza. La etapa de diafiltración elimina el 80 - 85% de la proteína que queda.

Filtración aséptica.

35 La solución concentrada de ácido hialurónico procedente del proceso de diafiltración se somete finalmente a una filtración a través de 0,22 μ m asépticamente (Millipore stericap: SCGPU02RE, PVDF material filtrante) que hace que el producto sea para aplicación biomédica. El producto así formado fue liofilizado para obtener hialuronato sódico de alto peso molecular de calidad médica.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7: Parámetros optimizados de preparación y purificación de HA.

40 *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 fue cultivado en un medio compuesto por 1% de extracto de levadura, 1% de hidrolizado enzimático de caseína, 0,2% de K_2HPO_4 , 0,15% de NaCl, 0,04% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, y 5% de sacarosa. El organismo fue desarrollado en 1 L de medio a 37° C a 400 rpm durante 24 h a 1 vvm de aireación. El pH del medio se mantuvo en 7,0 mediante la adición continua de solución acuosa de NaOH. Después de la
45 incubación, el caldo se diluyó con 1 volumen de agua y se clarificó mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min a 4° C. El HA del caldo clarificado fue precipitado con un volumen igual de isopropanol. El precipitado separado mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min a 4° C se suspende en 1 L de acetato sódico al 3% usando un
50 homogeneizador mecánico (Kinematica-A.G., polytron P T 2100) a 15000 rpm durante 10 min \times 3 ciclos. La solución homogeneizada se trata con gel de sílice al 2% de concentración final para la adsorción de proteína. Esta etapa elimina el 85% de proteína. El gel de sílice se separa de la solución de hialuronato sódico mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min a 4° C. Se hizo un posterior tratamiento de la solución de ácido hialurónico de alto peso molecular con un sistema filtrante por adsorción por carbón de 0,45 μ m (Millipore, Millistak +, minicápsula de ca
rbón activado M40AC23HH3). La velocidad de flujo era 14 ml/min. Esta etapa eliminó el 60% de la proteína restante.

El flujo que pasa a través del filtro de carbón se purificó más usando un procedimiento de diafiltración en modo continuo. La solución diluida de HA fue bombeada (velocidad de flujo 15 ml - 20 ml/min) en el recipiente de un filtro

de flujo tangencial equipado con una casete de poliéter sulfona con un valor de corte de 50 kDa (Sartocon slice cassette mod. No. 3051465001E-SG). Al iniciarse la alimentación del caldo acuoso en el filtro, se cerró la válvula de permeado para recircular el caldo acuoso varias veces hasta que el sistema era estable y no se observaban burbujas en el retentado. La válvula de permeado se abrió al cabo de 10 min y el caldo acuoso se recirculó al depósito de alimentación durante 10 min más, para asegurarse de que no había fugas de HA a través de la membrana por la válvula de permeado. Después de 15 min se recogieron por separado el permeado y el retentado. Se añadieron de forma continua cinco volúmenes equivalentes de agua destilada estéril libre de pirógenos en el depósito que contiene la solución de HA. Esta adición de agua a la solución de HA se hizo a la misma velocidad de flujo que la velocidad de salida del filtrado. La presión de entrada del recipiente del filtro de flujo tangencial se mantuvo alrededor de 0,5 – 1,5 bares. El retentado se usó para una mayor recuperación de ácido hialurónico y el permeado se desechó. Esencialmente, el permeado no contenía HA. El retentado se concentró al volumen original y se analizó para determinar su pureza. La etapa de diafiltración elimina el 70% de la proteína que queda.

La solución concentrada de ácido hialurónico procedente del proceso de diafiltración se somete finalmente a filtración aséptica por 0,22µm (Millipore stericup: SCGPU02RE, PVDF material filtrante) que hace al producto apto para aplicación médica. El producto así formado fue liofilizado para obtener hialuronato sódico de alto peso molecular de calidad médica, con un contenido de proteína residual de 0,031% con respecto al HA con una recuperación del 51%.

EJEMPLO 8

El proceso del Ejemplo 1 fue escalado a 10 L. La recuperación de HA y el perfil de purificación pudieron ser reírosucidos. El producto final tuvo por resultado un producto que tenía 0,066% de proteína con respecto al HA y la recuperación de HA fue el 82%.

EJEMPLO 9: Análisis relativo.

La tabla que sigue indica el análisis relativo:

S. N°	HA purificado/ tratado con	Volumen ml	rendimiento de HA mg/ml	Proteína mg/ml	HA Total mg	Proteína Total mg	% Proteína respecto a HA
1	IPA	100	3,376	0,56	337,6	56	14,22
2	Gel de sílice	90	3,22	0,15	289,8	13,5	4,45
3	Carbón	90	3,114	0,0187	280,26	1,68	0,6
4	Diafiltración (5x)	128	1,716	0,0014	219,6	0,179	0,075
5	filtración 0,22 µm	128	1,96	0,0011	250,88	0,14	0,056

“IPA” se refiere a isopropanol; “S. N°” se refiere al número de etapas.

EJEMPLO 10: Especificación del producto.

El producto final fue ensayado en relación con su proteína, ácidos nucleicos, aspecto, pH, contenido de ácido glucurónico, peso molecular, espectro de IR, contenido de cloruros, y contenido de humedad. Se produjo un HA que tiene un peso molecular de 3,0 – 3,5 millones de Daltons. Las pruebas mencionadas antes y las especificaciones del material se exponen en la Farmacopea Británica 2003. Los resultados comparativos se tabulan a continuación:

SR. N°	PRUEBA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
1	Aspecto de la solución	Solución transparente; la absorbancia de la solución medida a 600 nm no es mayor que 0,01	Solución transparente; la absorbancia de la solución medida a 600 nm es 0,004
2	Espectrofotometría de IR	El espectro de la sustancia de prueba corresponde al espectro de referencia del hialuronato sódico	Cumple
3	pH	En el intervalo de 5,0 a 8,5	6,65
4	Ácidos nucleicos	La absorbancia a 260 nm no excede de 0,5	0,033
5	Proteína	No más del 0,3%. Si se destina al uso en preparados parenterales, no más del 0,1%	0,056%

SR. N°	PRUEBA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
6	Cloruros	0,5% (máx.)	Cumple
7	Pérdida en el secado	No más del 20% en peso	18,2%
8	Ensayo	No menos del 95,0% y no más del 105,0% de hialuronato sódico calculado con referencia a la sustancia seca	99,2%

Determinación del peso molecular.

El peso molecular del HA se determinó mediante cromatografía de exclusión de tamaños en columna Shodex OH Pak SB 804-805HQ por HPLC. La fase móvil usada fue NaNO_3 0,1 M a una velocidad de flujo de 1 ml/min usando un detector RI. El peso molecular era $3,9 \times 10^6$ Da en 24 h.

- 5 Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en el presente texto pueden hacerse y ejecutarse sin una excesiva experimentación a la luz de la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1ª. Un procedimiento para preparar un ácido hialurónico (HA) o su sal, que comprende:

- (a) proporcionar una bacteria *Streptococcus* capaz de producir HA;
- 5 (b) proporcionar un medio nutriente para cultivar la bacteria, en donde el medio nutriente comprende una sal del ion zinc divalente, 1% de hidrolizado de caseína, y 5% de una fuente de carbono elegida entre el grupo que consiste en lactosa y sacarosa;
- (c) cultivar la bacteria en el medio nutriente; y
- (d) fermentar el medio nutriente bajo condiciones aerobias,

en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular de al menos 1 millón de Da.

10 2ª. Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que:

- la fermentación es continua;
- la sal del ion de metal divalente es $ZnSO_4$; o
- la bacteria se elige entre el grupo consistente en *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* y *Streptococcus pyogenes*.

15 3ª. Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la etapa de fermentación se realiza durante al menos 15 horas a una temperatura de 30 a 40°C, una velocidad de agitación de 300 a 500 rpm, una aireación de 1 a 3 vvm, y un pH neutro.

20 4ª. Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que el HA tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente $3,5 \times 10^6$ Da a $4,0 \times 10^6$ Da, y el procedimiento produce un rendimiento de al menos 5 g de HA de alto peso molecular por litro de medio nutriente.

5ª. Un procedimiento según la reivindicación 4ª, en el que el peso molecular del HA es al menos 3×10^6 Da al cabo de 24 horas de fermentación.

6ª. Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la bacteria es *Streptococcus zooepidemicus*.

7ª. Un procedimiento según la reivindicación 1ª, que comprende además:

- 25 (e) diluir y clarificar el medio nutriente;
- (f) precipitar el HA presente en el medio diluido con un disolvente;
- (g) disolver el HA precipitado o su sal en una solución;
- (h) añadir gel de sílice a la solución de HA o a la solución de sal de HA de la etapa (g) y después eliminar el gel de sílice;
- 30 (i) tratar la solución de HA o la solución de sal de HA de la etapa (h) con carbón activo; y
- (j) diafiltrar la solución de HA o la solución de sal de HA de la etapa (i) usando un disolvente;

en donde el procedimiento se realiza en ausencia de cualquier detergente o agente tensioactivo, o formalina, y a un pH neutro.

35 8ª. Un procedimiento según la reivindicación 7ª, en el que la etapa (f) comprende precipitar el HA con un volumen igual de dicho disolvente; y en el que la etapa (j) comprende diafiltrar la solución de HA o la solución de sal de HA de la etapa (i) usando aproximadamente 5 volúmenes de disolvente.

9ª. Un procedimiento según la reivindicación 8ª, en el que:

- (a') el HA precipitado en la etapa (f) se convierte en su sal, y después se homogeneiza en la solución de la etapa (g);
- 40 (b') la solución de la etapa (g) es acetato sódico al 3%;
- (c') el gel de sílice se elimina mediante centrifugación en la etapa (h);
- (d') el carbón activo está impregnado sobre un cartucho de celulosa en la etapa (i); o

(e') el disolvente de la etapa (j) es agua estéril libre de pirógenos.

10ª. Un procedimiento según la reivindicación 8ª, en el que el disolvente usado en la etapa (f) se elige entre isopropanol, etanol y acetona.

11ª. Un procedimiento según la reivindicación 10ª, en el que el disolvente es isopropanol.

5 12ª. El procedimiento según la reivindicación 8ª, que comprende además:

(k) aislar el HA estéril purificado, o su sal, por filtración a través de un filtro aséptico; y

(l) liofilizar el HA, o su sal, hasta que el contenido de humedad es menor que 5%.

13ª. Un procedimiento según la reivindicación 8ª, en el que el disolvente de la etapa (f) es isopropanol y el método comprende además liofilizar el HA o su sal hasta que el contenido de humedad es menor que 5%.

10 14ª. Un procedimiento para preparar un ácido hialurónico (HA) o su sal, que comprende:

(a) proporcionar una bacteria *Streptococcus* capaz de producir HA;

(b) proporcionar un medio nutriente para cultivar la bacteria, en donde el medio nutriente comprende zinc, hidrolizado de caseína a una concentración de 10 g/L, y una fuente de carbono elegida entre el grupo que consiste en lactosa y sacarosa a una concentración de 50 g/L;

15 (c) cultivar la bacteria en el medio nutriente; y

(d) fermentar el medio nutriente bajo condiciones aerobias,

en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular de al menos 1 millón Da.

Figura 1

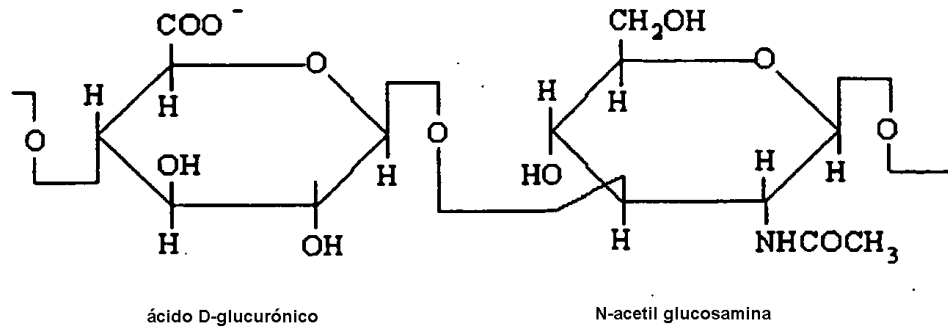


Figura 2

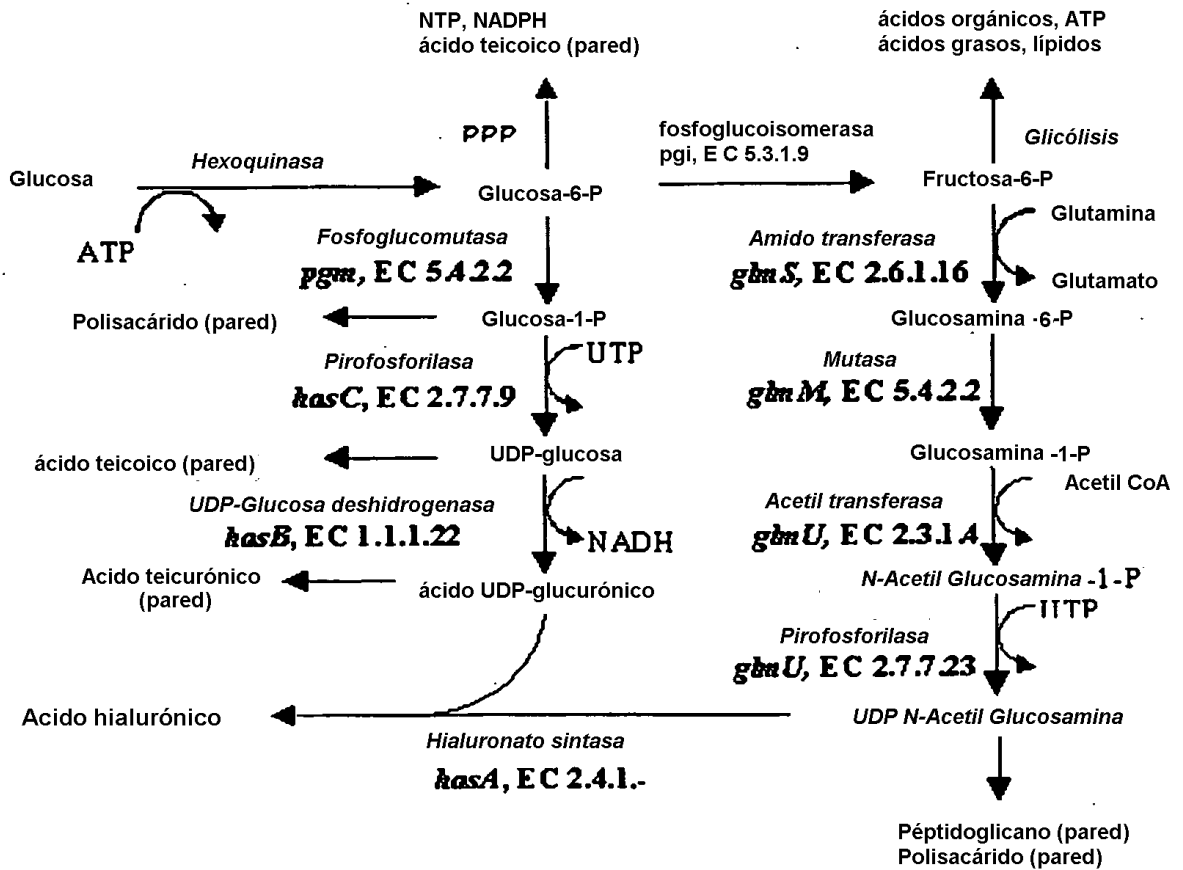


Figura 3

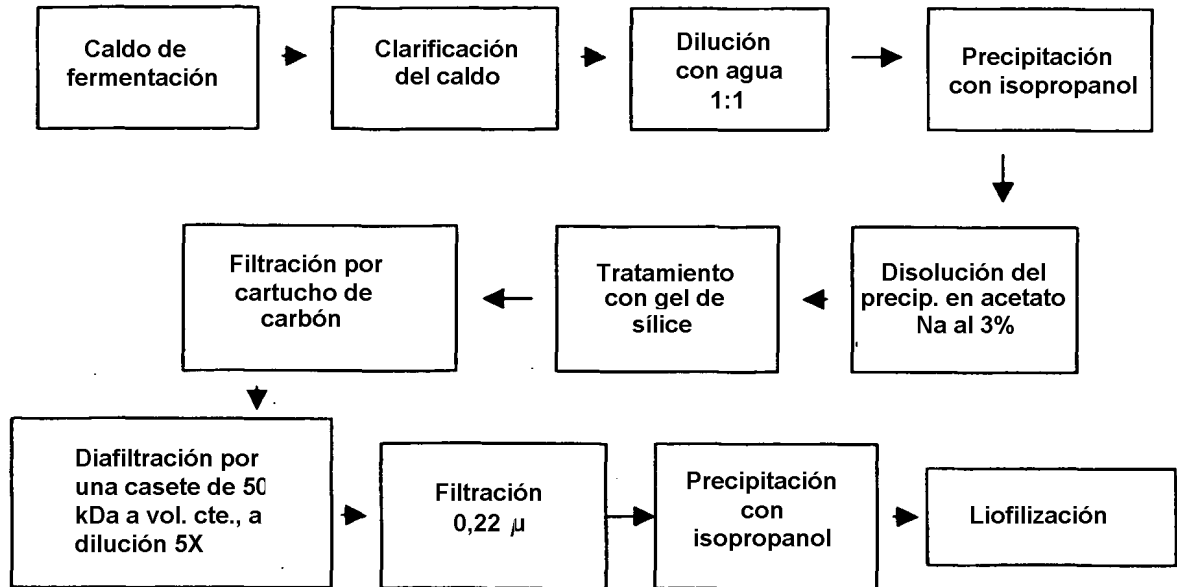


Figura 4

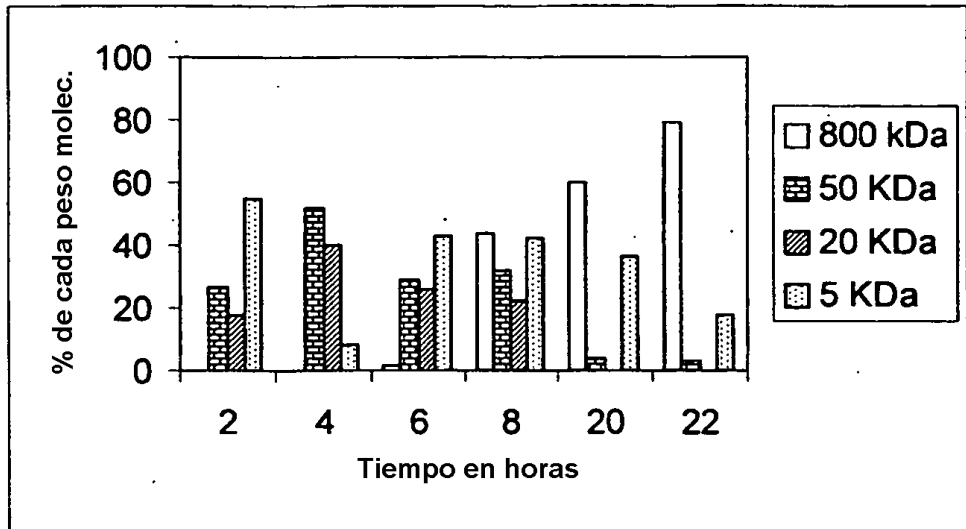


Figura 5

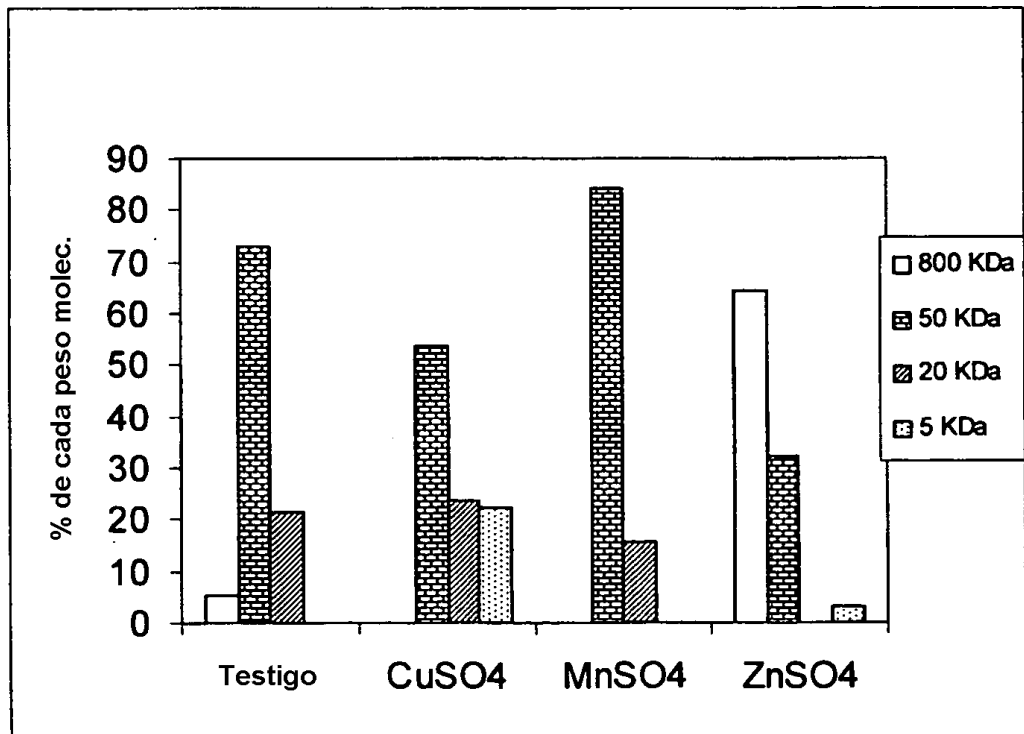


Figura 6

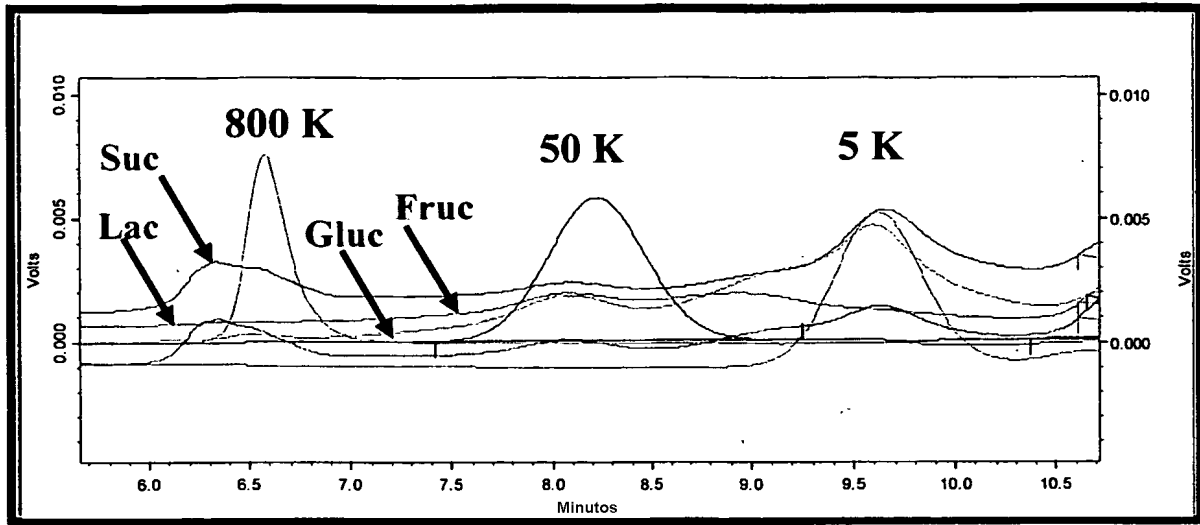


Figura 7

