

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 625**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

C08K 3/00 (2006.01)

C08K 3/04 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 10817410 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2479194**

54 Título: **Método para fabricar ácido hialurónico de bajo peso molecular**

30 Prioridad:

15.09.2009 KR 20090087185

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.05.2015

73 Titular/es:

**ILDONG PHARM CO., LTD. (100.0%)
60 Yangjae-dong Seocho-gu
Seoul 137-733, KR**

72 Inventor/es:

**KANG, DAE-JUNG;
IM, JONG-HYUK y
KANG, JAE-HOON**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 535 625 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

Método para fabricar ácido hialurónico de bajo peso molecular

Campo técnico

5 Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente Coreana N° 10-2009-0087185, presentado el 15 de septiembre de 2010.

La presente invención se refiere a un método para disminuir el peso molecular del ácido hialurónico de alto peso molecular mientras se mantienen las características propias del ácido hialurónico de alto peso molecular tales como viscosidad, elasticidad, y absorción de humedad. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método de producción de ácido hialurónico de bajo peso molecular de alta calidad aplicable industrialmente a través de la descomposición del medio que va a reaccionar con el ácido hialurónico, y a condiciones eficaces de producción de bajo peso molecular.

Antecedentes en la técnica

15 El ácido hialurónico ((HA), Hialuronano, (C₁₄H₂₀NNaO₁₁)_n (n > 1000)) es un polímero que existe en los organismos vivos, y es un polisacárido, denominado glicosaminoglicano. Tiene la estructura que se muestra en la [Figura 1], que está compuesta por unidades alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina, unidas a través de enlaces glicosídicos β-1,3 y β-1,4 alternantes. Es un material soluble en agua y su peso molecular de uso presenta un amplio intervalo de 1000 a 13.000.000 Da (daltons). Además, tiene una estructura de cadena lineal.

20 En 1934, Meyer y Palmer descubrieron el ácido hialurónico en humor vítreo de ojo de vaca, y que se distribuye en abundancia en la piel, cuerpos vítreos ópticos, fluidos articulares, músculos, cordón umbilical, cresta del gallo, etc. De ese modo, el ácido hialurónico es obtenido de estos órganos por separación y extracción. Especialmente, es sabido que está presente en abundancia en la placenta o en las articulaciones, y que se extrae generalmente de la cresta de gallo. Sin embargo, es sabido que en la producción de ácido hialurónico a partir de tejidos biológicos, es difícil separar un polímero, tal como la condritina, y que existe el riesgo de presencia de materiales patógenos derivados de animales.

25 El ácido hialurónico con estructura salina muestra una elevada eficacia y un alto efecto, y muestra un potente efecto lubricante en un estado de fricción física debido a su alto efecto humectante. Además, tiene ventajas preferentes en diversos efectos y propiedades tales como protección frente a una invasión bacteriana, etc. De ese modo, se ha producido recientemente el desarrollo de diversos productos que usan el ácido hialurónico. Estas ventajas se pueden aplicar a suplementos médicos, biomateriales, y alimentos así como desempeña un papel en suministros médicos o cosméticos. Además, los nuevos campos basados en el ácido hialurónico se están desarrollando continuamente.

30 El ácido hialurónico de alto peso molecular tiene ventajas funcionales tales como viscosidad aumentada, lubricación de articulaciones activa, y absorción de humedad y elasticidad. De ese modo, su uso se ha extendido a diversos campos de suministros médicos, tales como inyecciones para la articulación de la rodilla/ofitálmicas o gotas oculares. Considerando el extraordinario aumento reciente del mercado del ácido hialurónico a nivel mundial, se espera que se desarrollen derivados del ácido hialurónico.

A diferencia del ácido hialurónico de alto peso molecular, se ha subestimado la potencia del ácido hialurónico de bajo peso molecular. Sin embargo, se ha estudiado recientemente la capacidad de absorción corporal del ácido hialurónico de bajo peso molecular. En consecuencia, el uso de ácido hialurónico de bajo peso molecular ha adquirido protagonismo en cosméticos o alimentos que requieren capacidad de absorción tisular. De ese modo, se requiere el desarrollo de ácido hialurónico de bajo peso molecular, y de una tecnología para disminuir el peso molecular mientras se mantiene la función característica del ácido hialurónico.

45 Se han informado métodos para disminuir el peso molecular del ácido hialurónico de alto peso molecular en numerosas tesis y patentes. Por ejemplo, existe un método de hidrólisis mediante ácidos y bases (Publicación de Patente Japonesa sho 63-57602, Publicación de Patente Pyung 1-266102, Y. Tokita *et al.*, Polymer Degradation and Stability, 48, 269-273, 1995). Este método tiene la desventaja de que se añade un nuevo proceso y, después de tratamiento, se ha de aumentar o disminuir el pH hasta un valor en un intervalo convencional. En el método, la velocidad de cambio de pH puede variar de acuerdo con la concentración de ácido hialurónico. De ese modo, es difícil emplear el método en un proceso de fabricación real. Además, se ha descubierto que el ajuste de pH aumenta las impurezas, y especialmente aumenta los valores de endotoxinas. Por lo tanto, se ha de añadir un proceso de purificación para retirar las impurezas, aumentando de ese modo el coste. En la Patente CN 101020724A el ácido hialurónico obtenido por fermentación experimenta en primer lugar un proceso de purificación y a continuación se usa la enzima hialuronidasa para la degradación del ácido hialurónico de alto peso molecular puro en ácido hialurónico de bajo peso molecular. En la Patente US 2009/162905 A1 se usa hidróxido sódico para reducir el peso molecular promedio del ácido hialurónico hasta un valor deseado y a continuación se lleva a cabo un procedimiento de purificación.

50 En cambio, en un método de descomposición mediante ultrasonificación o tratamiento térmico a alta temperatura a un pH apropiado, se requiere que se introduzca una nueva máquina y, además, en el proceso de purificación, se produce además un coste innecesario. También, en un método que usa un agente oxidante tal como ácido hipocloroso (Publicación de Patente Japonesa Pyung 2-245193), un método que usa peróxido de hidrógeno (Publicación de Patente Japonesa Pyung 2-22301), y un método que usa la capacidad de descomposición del persulfato de amonio (Patente Registrada Coreana 10-0369517), se puede lograr la hidrólisis pero se ha de retirar el material de descomposición introducido. Además, la producción de endotoxinas u otras impurezas puede causar una baja calidad.

60 En los métodos mencionados anteriormente para disminuir el peso molecular del ácido hialurónico de elevado peso

molecular, durante el proceso de purificación, debido al promotor de descomposición introducido recientemente para el ajuste del peso molecular, sólo existe acción de descomposición. En otras palabras, en el proceso de purificación, se ha de detener el proceso de mejora de los materiales de partida, y a continuación se ha de introducir una máquina adicional para ajustar el peso molecular, y se produce un coste adicional. De ese modo, los métodos son ineficaces. En otras palabras, el proceso de tratamiento se hace más complicado, y la adición de procesos prolonga el tiempo requerido, aumentando de ese modo el coste. Desde el punto de vista industrial de producción en masa, estos son factores económicos muy ineficaces.

Divulgación

Problema técnico

Por lo tanto, los inventores de la presente invención investigaron un método para disminuir el peso molecular de ácido hialurónico de elevado peso molecular, en el que se consigue al mismo tiempo la retirada de impurezas y el ajuste del peso molecular. Descubrieron entonces que cuando se pone en contacto ácido hialurónico con carbón activado en las condiciones apropiadas, disminuye el peso molecular promedio del ácido hialurónico. Basándose en este descubrimiento, ellos concluyeron la presente invención.

La presente invención proporciona un método para disminuir el peso molecular de ácido hialurónico de elevado peso molecular. Más particularmente, la presente invención proporciona un método para producir económicamente ácido hialurónico de bajo peso molecular de alta calidad, en el que se solucionan los problemas de ineficacia de los métodos convencionales, tales como la degradación de la calidad causada por la producción de impurezas, y el aumento del coste causado por la adición de procesos complicados.

En consecuencia, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar ácido hialurónico de bajo peso molecular que comprende la etapa de poner en contacto ácido hialurónico con carbón activado.

Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para disminuir el peso molecular del ácido hialurónico que comprende la etapa de poner en contacto ácido hialurónico con carbón activado.

Solución técnica

Para conseguir el objetivo mencionado anteriormente, la presente invención proporciona un método para preparar ácido hialurónico de bajo peso molecular que comprende la etapa de poner en contacto ácido hialurónico con carbón activado.

Para conseguir otro objetivo, la presente invención proporciona un método para disminuir el peso molecular del ácido hialurónico que comprende la etapa de poner en contacto ácido hialurónico con carbón activado.

La presente invención proporciona un método de uso de carbón activado como medio de reacción con el fin de convertir ácido hialurónico de elevado peso molecular en ácido hialurónico de bajo peso molecular que tiene un peso molecular predeterminado, en el que el ácido hialurónico de alto peso molecular se obtiene mediante cultivo de microorganismos, extracción de cresta del gallo, o similar.

El ácido hialurónico de elevado peso molecular usado en la presente invención se puede obtener mediante cultivo de microorganismos, extracción de cresta de gallo, o similar. Un ejemplo de la obtención de ácido hialurónico de elevado peso molecular mediante cultivo de microorganismos es el que sigue a continuación.

Se selecciona *Streptococcus* sp. ID9102 (KCTC11395BP) como microorganismo productor de ácido hialurónico, y se cultiva en un fermentador de 75 l con glucosa (40-100g/l), extracto de levadura (2-5 g/l), peptona de caseína (10-20 g/l), sulfato de magnesio (0,5-1 g/l), dihidrogenofosfato potásico (1-5 g/l), cloruro sódico (2-10 g/l), y ácido glutámico (0,1-1 g/l), a pH 6,0-7,0, a 32-37 °C, en condiciones aeróbicas de 0,1-1 vvm. A continuación se produce ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio de 2.000.000-4.000.000 Da con una productividad en un intervalo de 4-6 g/l.

Del cultivo que contiene ácido hialurónico, se retira el microorganismo mediante un método conocido tal como centrifugación, prensado en filtro, filtrado en profundidad, y filtración de membrana. A continuación, el filtrado se usa como el ácido hialurónico de elevado peso molecular en la presente invención.

En la presente invención, el ácido hialurónico de elevado peso molecular se descompone en ácido hialurónico de bajo peso molecular que tiene un intervalo específico de peso molecular promedio, mediante carbón activado, y otras condiciones de conversión de bajo peso molecular.

La presente invención proporciona un método para preparar ácido hialurónico de bajo peso molecular que comprende la etapa de poner en contacto ácido hialurónico con carbón activado,

en el que el carbón activado es usado como medio de reacción con el fin de convertir ácido hialurónico de elevado peso molecular en ácido hialurónico de bajo peso molecular que tiene un peso molecular predeterminado y

en el que el ácido hialurónico de elevado peso molecular es obtenido mediante cultivo de microorganismos o extracción de cresta de gallo.

El método de la invención se caracteriza en que comprende la etapa de poner en contacto ácido hialurónico con carbón activado.

En la presente invención, el ácido hialurónico ((HA), Hialuronano, (C₁₄H₂₀NNaO₁₁)_n (n > 1000)) es un polímero que existe en los organismos vivos, y es un polisacárido, denominado glicosaminoglicano. Tiene la estructura que se muestra en la [Figura 1].

En la presente invención, el ácido hialurónico se puede obtener a partir de un tejido biológico tal como cresta de gallo mediante purificación, y se puede producir a partir de microorganismos transformados mediante métodos de ingeniería genética. El ácido hialurónico usado como material de partida de la presente invención se puede preparar mediante el método descrito anteriormente o adquirirse en fuentes comerciales. El peso molecular promedio del ácido hialurónico usado en el método de la presente invención no se limita de forma particular. Por ejemplo, el peso molecular promedio

del ácido hialurónico usado en la presente invención puede variar de 100.000 Da a 13.000.000 Da, de 1.000.000 Da a 13.000.000 Da, de 3.500.000 Da a 13.000.000 Da, de 3.500.000 Da a 10.000.000 Da, de 3.500.000 Da a 8.000.000 Da, preferentemente en el intervalo de 3.500.000 Da a 13.000.000 Da, y más preferiblemente en el intervalo de 3.500.000 Da a 8.000.000 Da.

5 En una realización de la presente invención, se seleccionó *Streptococcus* sp. ID9102 (KCTC11395BP) capaz de producir ácido hialurónico como microorganismo productor de ácido hialurónico, y se cultivó en un fermentador de 75 l con glucosa (40-100 g/l), extracto de levadura (2-5 g/l), peptona de caseína (10-20 g/l), sulfato de magnesio (0,5-1 g/l), dihidrogenofosfato potásico (1-5 g/l), cloruro sódico (2-10 g/l), y ácido glutámico (0,1-1 g/l), a pH 6,0-7,0, a 32-37 °C, en unas condiciones aeróbicas de 0,1-1 vvm de modo que se obtuvo ácido hialurónico.

10 El carbón activado indica un material carbonáceo que presenta una alta capacidad de absorción. Se obtiene por tratamiento de madera, lignito, o turba con un activador tal como cloruro de cinc o ácido fosfórico, seguido de secado, o es obtenido por activación de carbón vegetal con vapor de agua. En general, el carbón activado se prepara en un estado de polvo o en un estado de partículas. El carbón activado de tipo polvo se puede convertir en carbón activado de tipo partícula para su uso. Se usa principalmente como adsorbente para adsorber gases o la humedad, y se puede usar para diversos fines tales como recuperación de disolventes, purificación de gases, decoloración, o similares.

15 En la presente invención, el carbón activado se puede preparar directamente, o adquirirlo en fuentes comerciales. No existe ninguna limitación específica en la clase de carbón activado usado en la presente invención. Por ejemplo, puede ser carbón activado granular, carbón activado en polvo, o carbón activado paletizado, y preferiblemente puede ser carbón activado en polvo. El carbón activado en polvo se puede obtener mediante un método de activación de vapor o un método de activación química. No existe ninguna limitación específica en el método de activación.

20 En la etapa de poner en contacto el ácido hialurónico con el carbón activado, no existe ninguna limitación específica en el método de contacto. Preferentemente, el medio de cultivo purificado que contiene ácido hialurónico preparado mediante el método de cultivo de microorganismos, o la solución en diluyente de ácido hialurónico que contiene ácido hialurónico diluido en un disolvente se puede dispersar en carbón activado. El disolvente para diluir el ácido hialurónico no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede ser agua o un disolvente mixto de un alcohol inferior que presenta de 1 a 6 átomos de carbono y agua. Preferiblemente, puede ser agua.

25 En el medio de cultivo purificado que contiene ácido hialurónico o en la solución en diluyente de ácido hialurónico, la concentración de ácido hialurónico no se limita de manera particular, y puede variar de un 0,01 a un 90 %, de un 0,1 a un 50 %, de un 0,1 a un 30 %, o de un 0,1 a un 10 %. Preferiblemente, puede variar desde 0,1 a un 10 %.

30 Mediante la puesta en contacto, se produce una reacción del ácido hialurónico. Como resultado, se reduce el peso molecular. La reacción indica un fenómeno en respuesta a una estimulación, o cambio químico que se produce entre materiales.

35 El método de la presente invención puede comprender etapas adicionales para recoger el ácido hialurónico de la solución de reacción después de que haya terminado la reacción. Cualquier método es adecuado para recoger el ácido hialurónico de la solución de reacción siempre que sea un método de aislamiento y purificación bien conocido. Generalmente, se puede llevar a cabo mediante centrifugación, filtración, y similares para retirar el carbón activado y también se pueden llevar a cabo por electroforesis y diversas cromatografías en columna. Para las cromatografías, se pueden usar cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, HPLC, cromatografía en fase inversa, cromatografía en columna por afinidad, solas o en una combinación de las mismas, para recoger el ácido hialurónico.

40 El método de la presente invención tiene el efecto de disminuir el peso molecular del ácido hialurónico.

En la presente invención, no existe ninguna limitación específica en la proporción entre ácido hialurónico y carbón activado. Preferiblemente, la proporción puede variar de 1:2 a 1:6.

45 En la presente invención, no existe ninguna limitación específica en la temperatura y tiempo requeridos para poner en contacto el ácido hialurónico con el carbón activado. Pueden variar de acuerdo con el peso molecular del ácido hialurónico antes de ponerse en contacto con el carbón activado, y el peso molecular requerido del ácido hialurónico. Preferiblemente, la temperatura puede variar de 25 °C a 45 °C, y más preferiblemente la temperatura puede variar de 35 °C a 45 °C. El tiempo puede variar preferentemente de 3 a 18 horas, y más preferentemente varía de 6 a 18 horas.

50 A medida que aumenta la proporción de carbón activado o la temperatura de contacto, la proporción de reducción del peso molecular del ácido hialurónico por unidad de tiempo aumenta. A medida que aumenta el tiempo de contacto, disminuye el peso molecular promedio del ácido hialurónico obtenido después de la puesta en contacto. El peso molecular promedio del ácido hialurónico preparado mediante el método de la invención puede variar de acuerdo con el peso molecular del ácido hialurónico antes de ponerse en contacto con el carbón activado, la proporción de carbón activado, la temperatura de contacto, y el tiempo de contacto. De ese modo, no se limita de forma particular. Por ejemplo, el peso molecular promedio del ácido hialurónico producido en la presente invención puede variar de 10.000 Da a 3.000.000 Da, de 10.000 Da a 100.000 Da, de 100.000 Da a 500.000 Da, de 500.000 Da a 1.000.000 Da, de 1.000.000 Da a 2.000.000 Da, de 2.000.000 Da a 3.000.000 Da, de 3.000.000 Da a 4.000.000 Da, de 4.000.000 Da a 5.000.000 Da, de 5.000.000 Da a 6.000.000 Da, de 6.000.000 Da a 7.000.000 Da, de 7.000.000 Da a 8.000.000 Da, de 8.000.000 Da a 9.000.000 Da. Preferiblemente, puede variar de 10.000 Da a 3.000.000 Da, y más preferentemente puede variar de 10.000 Da a 2.000.000 Da.

60 El método de la presente invención tiene un proceso sencillo, y presenta factores fácilmente controlables (tales como la cantidad de carbón activado, temperatura y tiempo) para controlar la proporción de reducción del peso molecular de ácido hialurónico. Según se cambian los factores de control, la proporción de reducción del peso molecular de ácido hialurónico cambia regularmente de forma relativa. Esto es muy útil en la preparación de ácido hialurónico que presenta un peso molecular predeterminado. Además, tal característica puede retirar una gran cantidad de endotoxinas

65

contenidas en el medio de cultivo en el caso en que el ácido hialurónico se prepare mediante un cultivo de microorganismos.

De acuerdo con el método de preparación de la presente invención, es posible producir eficazmente ácido hialurónico que presente un peso molecular específico mediante un proceso sencillo. Además, es posible ajustar fácilmente y de forma estable el peso molecular del ácido hialurónico producido mediante el ajuste de la cantidad de carbón activado, la temperatura y el tiempo.

Entretanto, la presente invención proporciona un método para disminuir el peso molecular de ácido hialurónico que comprende la etapa de poner en contacto ácido hialurónico con carbón activado, en el que el carbón activado es usado como medio de reacción con el fin de convertir ácido hialurónico de elevado peso molecular en ácido hialurónico de bajo peso molecular que presenta un peso molecular predeterminado, y en el que el ácido hialurónico de elevado peso molecular se obtiene mediante cultivo de microorganismos o extracción de la cresta de gallo.

Se desvela por primera vez en la presente invención la disminución del peso molecular de ácido hialurónico al poner en contacto el ácido hialurónico con carbón activado.

En el método de la presente invención, el ácido hialurónico que se va poner en contacto con carbón activado, el peso molecular del ácido hialurónico, el carbón activado, y la clase de carbón activado, la proporción de ácido hialurónico con respecto al carbón activado, el método de contacto, las condiciones de contacto (disolvente, concentración de ácido hialurónico, y similares), la temperatura de contacto, el tiempo de contacto, el efecto del contacto, el peso molecular disminuido del ácido hialurónico obtenido después de ponerse en contacto con el carbón activado, y otros efectos, son los mismos que los que se han descrito en el método de preparación arriba indicado.

Estas características de la presente invención se pueden entender fácilmente con referencia a los Ejemplos de la presente invención.

De acuerdo con un Ejemplo de la presente invención, se cultivó un microorganismo, *Streptococcus* sp., que producía ácido hialurónico de modo que produjera ácido hialurónico. A continuación, se purificó el ácido hialurónico. Se dispersó carbón activado a diversas proporciones en el medio de cultivo purificado y se puso en contacto con el ácido hialurónico en diversas condiciones de temperatura con varios tiempos. A continuación, se recogió el ácido hialurónico, y se midió su peso molecular.

En condiciones de 25 °C a 45 °C, cuando el ácido hialurónico se puso en contacto con carbón activado durante 3 a 18 horas, el ácido hialurónico de 3.500.000 Da se convirtió en ácido hialurónico que tenía diversos pesos moleculares de 10.000 Da a 3.000.000 Da.

De acuerdo con otro Ejemplo de la presente invención, se usó ácido hialurónico extraído y purificado de cresta de gallo en el mismo experimento mediante dilución. A continuación, se midió el resultado.

Como resultado, cuando se usó el ácido hialurónico extraído/purificado a partir de cresta de gallo, fue posible preparar ácido hialurónico que tenía un peso molecular disminuido de la misma manera que con el cultivo de un microorganismo que produce ácido hialurónico.

De ese modo, mediante el método de la presente invención, es posible reducir eficazmente el peso molecular del ácido hialurónico independientemente del método de preparación del ácido hialurónico o de las condiciones de contacto entre el ácido hialurónico y el carbón activado.

En un Ejemplo de la presente invención, se cultivó 1 t de ácido hialurónico que tenía un peso molecular promedio de 3.500.000 Da, y se hizo reaccionar con carbón activado en una cantidad de cuatro veces el peso de ácido hialurónico durante 4 horas a una temperatura de reacción de 45 °C. A continuación, se preparó ácido hialurónico con un peso molecular promedio de 2.000.000 Da.

En otros Ejemplos de la presente invención, en las mismas condiciones que las del Ejemplo anterior, durante diversos tiempos de reacción de 6, 7 u 8 horas, se preparó ácido hialurónico, y se midió el peso molecular promedio. Como resultado, de acuerdo con el tiempo de reacción, se preparó ácido hialurónico con pesos moleculares promedio de 1.000.000 Da, 500.000 Da y 100.000 Da.

En consecuencia, en el método de la invención, es posible ajustar fácilmente el peso molecular del ácido hialurónico ajustando diversos factores tales como la proporción de carbón activado, la temperatura, y el tiempo de reacción. Además, el método de la invención es un método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular de alta calidad aplicable industrialmente.

Efectos ventajosos

El método de la presente invención para disminuir el peso molecular de ácido hialurónico de elevado peso molecular es un proceso conveniente sin los inconvenientes de reprocesar la retirada de materiales de alimentación, o requerir tratamiento de pH, diversos catalizadores de reacción, y condiciones de tratamiento adicionales complicadas (tales como tratamiento térmico) como en los métodos convencionales. Además, el método tiene el efecto de retirar impurezas. De ese modo, mediante el método, es posible producir de forma conveniente y económica ácido hialurónico de bajo peso molecular con una pureza elevada. El método de la invención para disminuir el peso molecular tiene la ventaja de que de acuerdo con el cambio de las condiciones de reacción usando carbón activado, el peso molecular del ácido hialurónico de bajo peso molecular se puede ajustar de forma diversa. El ácido hialurónico de bajo peso molecular producido mediante el método de la presente invención se puede producir de acuerdo con los estándares de los suministros médicos mientras que se pueden mantener las características propias del ácido hialurónico. Además, se puede producir de acuerdo con los estándares de los cosméticos o los alimentos.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una unidad de repetición de ácido hialurónico, la cual está compuesta por unidades alternantes de

ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina, unidas a través de enlaces β -1,3 y β -1,4 alternantes;

la Figura 2 es un gráfico que muestra el cambio de peso molecular del ácido hialurónico de acuerdo con diversas clases de carbón activado y las concentraciones respectivas a 25 °C (2X, 4X, 6X : cantidad de carbón activado administrada con respecto al ácido hialurónico, CA1, CGSP, CASP, CN1, SX-PLUS, SX-ULTRA, DARCO KBB, DARCO A-51: clase de carbón activado usado, Norit®CA1, Norit® CGSP, Norit® CASP, Norit® CN1, Norit® SX-PLUS, Norit® SX-ULTRA, Norit® DARCO KBB, Norit® DARCO A-51);

la Figura 3 es un gráfico que muestra el cambio de peso molecular del ácido hialurónico de acuerdo con diversas clases de carbón activado y las concentraciones respectivas a 35 °C (2X, 4X, 6X : cantidad de carbón activado administrada con respecto al ácido hialurónico, CA1, CGSP, CASP, CN1, S-51HF, SA-SUPER, SX-PLUS, SX-1G, SX-ULTRA, PAC-200C, DARCO KBB, DARCO A-51: la clase de carbón activado usado, Norit® CA1, Norit® CGSP, Norit® CASP, Norit® CN1, Norit® S-51HF, Norit® SA-SUPER, Norit® SX-PLUS, Norit® SX-1G, Norit® SX-ULTRA, Norit® PAC-200C, Norit® DARCO KBB, Norit® DARCO A-51) y

la Figura 4 es un gráfico que muestra el cambio de peso molecular del ácido hialurónico de acuerdo con diversas clases de carbón activado y las concentraciones respectivas a 45 °C (2X, 4X, 6X : cantidad de carbón activado administrada con respecto al ácido hialurónico, CA1, CGSP, CASP, CN1, S-51HF, SA-SUPER, SX-PLUS, SX-1G, SX-ULTRA, PAC-200C, DARCO KBB, DARCO A-51: la clase de carbón activado usado, Norit® CA1, Norit® CGSP, Norit® CASP, Norit® CN1, Norit® S-51HF, Norit® SA-SUPER, Norit® SX-PLUS, Norit® SX-1G, Norit® SX-ULTRA, Norit® PAC-200C, Norit® DARCO KBB, Norit® DARCO A-51).

Modo para la invención

En adelante, se describirán realizaciones a título de ejemplo de la presente invención con referencia a los dibujos que se acompañan.

En la presente invención, se midió la concentración de ácido hialurónico existente en una solución mediante el método de carbazol (T. Bitter, Anal. Biochem., 1962, 4, 330-334). El peso molecular promedio del ácido hialurónico se obtuvo mediante cromatografía en gel (Narlin B. Beaty *et al.*, Anal. Biochem., 1985, 147, 387-395). Las condiciones de análisis incluyen una columna de gel Toyo Soda TSK G6000PWXL, y una fase móvil de NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 3 mM (pH 7,0), y NaN₃ al 0,02 %. Para la detección, se usó un detector de índice de refracción (Shodex). Como material de referencia, se preparó óxido de polietileno a una concentración de 2 mg/ml. Como endotoxina, se cuantificó un reactivo de LAL disponible en el mercado de Charles River Laboratories Korea. Dentro del intervalo de menos de una dilución múltiple eficaz máxima, la dilución múltiple se ajustó a 3 puntos. Se determinó que, a partir de un grupo de control negativo, no se detectó ninguna endotoxina y, a través de un control de producto positivo, no hubo ningún factor de interferencia de reacción.

En los Ejemplos que siguen, una concentración de cada uno del ácido hialurónico de elevado peso molecular extraído a partir de un microorganismo, y el ácido hialurónico de elevado peso molecular extraído de cresta de gallo, se ajustó a un valor predeterminado, y a continuación se produjo ácido hialurónico de bajo peso molecular de acuerdo con el cambio de las condiciones de reacción usando carbón activado como medio para producir ácido hialurónico de bajo peso molecular. El cambio del peso molecular promedio del ácido hialurónico de bajo peso molecular producido se describirá más adelante.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no se pretende que limiten la misma.

<Ejemplo 1>

Método para producir ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado CA1

En este Ejemplo, como material de partida para producir ácido hialurónico de bajo peso molecular, se usó una composición purificada a partir de un cultivo obtenido mediante cultivo de *Streptococcus* sp. ID9102 (KCTC11395BP) como microorganismo productor. El peso molecular promedio del ácido hialurónico incluido en el material de partida es 3.500.000 Da, y la concentración de endotoxina es mucho mayor de 0,5 EU/mg.

Las condiciones de cultivo son las que se indican a continuación:

Se seleccionó *Streptococcus* sp. ID9102 (KCTC11395BP) como microorganismo productor de ácido hialurónico, y se cultivó en un fermentador de 75 l que contenía glucosa (40-100 g/l), extracto de levadura (2-5 g/l), peptona de caseína (10-20 g/l), sulfato de magnesio (0,5-1 g/l), dihidrogenofosfato potásico (1-5 g/l), cloruro sódico (2-10 g/l), y ácido glutámico (0,1-1 g/l), a pH 6,0-7,0, a 32-37 °C, bajo una condición aeróbica de 0,1-1 vvm.

Las condiciones de reacción básicas son las que se indican a continuación:

Para obtener una fuerza de agitación apropiada y una reactividad del ácido hialurónico purificado a partir de ultrafiltración y el carbón activado Norit® CA1 (denominado en lo sucesivo en el presente documento CA1, Norit, Países Bajos, Norit® - los carbones activados usados en los Ejemplos se produjeron a partir de Norit), la concentración del ácido hialurónico se ajustó a 2,5 g HA/l. A continuación, se introdujo el ácido hialurónico en una cantidad de 300 ml en un vaso de precipitados de vidrio de 1 l, y se introdujo el carbón activado CA1 en el vaso de precipitados con una concentración dos veces, 4 veces y 6 veces mayor que la concentración del ácido hialurónico. A continuación, se hizo girar un impulsor (diámetro de 5 cm) hecho de teflón a una velocidad de 300 rpm mientras se mantenían las condiciones de reacción predeterminadas. Con el fin de evitar al máximo la mezcla de impurezas o la evaporación del líquido de

reacción hasta la finalización de la reacción, las partes de impulsor distintas de la parte de rotación del impulsor se cerraron herméticamente con una cubierta. Las temperaturas de reacción fueron 25 °C, 35 °C, y 45 °C.

Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 1]. De acuerdo con el aumento de la temperatura de reacción, la capacidad de descomposición del carbón activado CA1 aumento, aumentando de ese modo la velocidad de disminución del peso molecular del ácido hialurónico. A 25 °C, en las condiciones de CA1 2X, durante 6 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 2.000.000 Da, y durante 18 horas, se obtuvo un peso molecular de 1.500.000 Da. A 25 °C, y CA1 4X, durante 18 horas, se obtuvo un peso molecular de aproximadamente 1.000.000 Da, y a CA1 6X, durante 6 horas, se obtuvo un peso molecular de aproximadamente 1.000.000 Da, y durante 18 horas, se obtuvo un peso molecular de 500.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 35 °C, aunque la concentración tuvo una reactividad 2X menor que a 25 °C, la capacidad de descomposición del peso molecular fue similar que la de 25 °C. A 35 °C, con 6X, durante 18 horas, se obtuvo un peso molecular de 130.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 45 °C, aunque la concentración tuvo una reactividad 2X menor que a 35 °C, la capacidad de descomposición del peso molecular fue similar que la de 35 °C. Con 6X, se obtuvo un peso molecular de 15.000 Da. En todas las condiciones de reacción, la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg. Además, se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina. Además, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en un 92 % o superior, en todas las condiciones de reacción. De ese modo, se descubrió que no existe ninguna preocupación por la falta de ácido hialurónico.

Tabla 1

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado CA1										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HAl		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3519	2089	1485	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,51	2,48	2,34
25 °C	4X	3519	1485	994	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,52	2,46	2,44
25 °C	6X	3519	975	523	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,50	2,43	2,41
35 °C	2X	3449	1485	975	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,50	2,47	2,31
35 °C	4X	3519	975	513	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,50	2,45	2,42
35 °C	6X	3519	503	134	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,47	2,41	2,39
45 °C	2X	3519	955	523	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,49	2,45	2,32
45 °C	4X	3519	473	129	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,51	2,44	2,42
45 °C	6X	3519	16	15	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,47	2,41	2,38

<Ejemplo 2>

25 **Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado CGSP**

Se usaron el ácido hialurónico y las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® CGSP (en lo sucesivo en el presente documento CGSP) en lugar de CA1 como medio para producir ácido hialurónico de bajo peso molecular para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 2]. Como el carbón activado CA1, de acuerdo con el aumento de la temperatura de reacción, la capacidad de descomposición del carbón activado CGSP aumentó, aumentando de ese modo la velocidad de disminución del peso molecular del ácido hialurónico. A 25 °C, en las condiciones de CGSP 4X, durante 18 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y a 6x durante 18 horas, se obtuvo un peso molecular de 500.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 35 °C, aunque la concentración tuvo una reactividad 2X menor que a 25 °C, la capacidad de descomposición del peso molecular fue similar que la de 25 °C. Especialmente, en el caso de 6x a 45 °C, el resultado alcanzó 10.000 Da de peso molecular. En estas condiciones de reacción, los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg. Como en los resultados de CA1, se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina. Además, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción. De ese modo, los inventores confirmaron la estabilidad del ácido hialurónico y el efecto del carbón activado CGSP.

Tabla 2

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado CGSP										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3590	2553	1515	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,52	2,59	2,47
25 °C	4X	3449	2263	1015	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,52	2,49	2,50
25 °C	6X	3449	1456	513	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,48	2,45	2,40
35 °C	2X	3449	2047	936	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,52	2,45	2,39
35 °C	4X	3449	1515	503	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,51	2,50	2,41
35 °C	6X	3519	975	134	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,50	2,48	2,41
45 °C	2X	3449	814	534	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,48	2,42	2,39
45 °C	4X	3449	437	139	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,47	2,45	2,34
45 °C	6X	3449	18	12	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,45	2,40	2,32

5

<Ejemplo 3>**Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado CASP**

Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® CASP (en lo sucesivo en el presente documento CASP) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

10

Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 3]. Como los carbones activados CA1 y CGSP, de acuerdo con un aumento de la temperatura de reacción, la capacidad de descomposición del carbón activado CASP también aumentó, aumentando de ese modo la velocidad de disminución del peso molecular del ácido hialurónico. A 25 °C, en las condiciones de CASP 4X, durante 18 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 35 °C, aunque la concentración tuvo una reactividad 2X menor que a 25 °C, la capacidad de descomposición del peso molecular fue similar que la de 25 °C. En el caso de 45 °C, la capacidad de descomposición aumentó de forma elevada y en el caso de 2x durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y durante 18 h, 5000.000 Da y en el caso de 2X, durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, durante 18 h, 500.000 Da, 18 h, 100.000 Da. En el caso de 6x, la capacidad de descomposición aumentó de la forma más elevada, y por lo tanto los presentes inventores confirmaron que durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 15.000 Da y durante 18 h, de 12.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina como los resultados de CA1 y CGSP. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de CASP.

25

Tabla 3

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado CASP										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3449	2605	1515	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,53	2,50	2,35
25 °C	4X	3519	2218	994	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,51	2,48	2,43
25 °C	6X	3449	1456	428	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,55	2,42	2,42
35 °C	2X	3449	2007	955	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,52	2,47	2,33
35 °C	4X	3519	1515	483	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,48	2,46	2,42
35 °C	6X	3449	1015	129	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,40	2,41
45 °C	2X	3449	918	513	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,50	2,47	2,32

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado CASP										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
45 °C	4X	3519	483	126	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,50	2,44	2,42
45 °C	6X	3449	16	10	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,49	2,42	2,38

<Ejemplo 4>**Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado CN1**

5 Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® CN1 (en lo sucesivo CN1) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular. Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 4]. De acuerdo con el aumento de la temperatura de reacción, la capacidad de descomposición del carbón activado CASP también aumentó, aumentando de ese modo la velocidad de disminución del peso molecular del ácido hialurónico. A 25 °C, en las condiciones de CN1 4X, durante 18 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 35 °C, la capacidad de descomposición aumentó de forma elevada y en el caso de 4x durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y durante 18 h, de 5000.000 Da. En el caso de 45 °C, a 2x durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y a 4x durante 6 h de 500.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de CN1.

Tabla 4

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado CN1										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3302	2981	1932	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,51	2,51	2,48
25 °C	4X	3236	1832	937	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,5	2,48	2,44
25 °C	6X	3221	1456	612	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,52	2,49	2,43
35 °C	2X	3209	2007	955	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,52	2,47	2,45
35 °C	4X	2836	1284	583	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,48	2,46	2,42
35 °C	6X	2732	916	329	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,5	2,49
45 °C	2X	3018	1096	363	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,5	2,47	2,35
45 °C	4X	2701	530	151	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,49	2,46	2,45
45 °C	6X	2451	206	11	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,48	2,47	2,39

<Ejemplo 5>**Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado S-51HF**

25 Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® S-51HF (en lo sucesivo S-51HF) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular. Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 5]. De acuerdo con el aumento de la temperatura de reacción, la capacidad de descomposición del carbón activado S-51HF también aumentó, aumentando de ese modo la velocidad de disminución del peso molecular del ácido hialurónico. A 35 °C, en las condiciones de S-51 HF 6X, durante 6 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 45 °C, a 2x durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y a 4x durante 6 h, de 5000.000 Da y en el caso de 6x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de

reacción de S-51HF.

Tabla 5

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado 51HF										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
35 °C	2X	3382	2558	1416	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,51	2,46	2,44
35 °C	4X	3367	1592	724	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,47	2,45	2,41
35 °C	6X	2974	1077	418	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,53	2,49	2,48
45 °C	2X	3186	1288	452	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,49	2,46	2,34
45 °C	4X	2941	623	188	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,48	2,45	2,44
45 °C	6X	2669	242	13	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,47	2,46	2,38

<Ejemplo 6>

Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado SA-SUPER

10 Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® SA-SUPER (en lo sucesivo SA-SUPER) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

15 Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 6]. A 35 °C, en las condiciones de SA-SUPER 2X y 4X, durante 18 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 500.000 Da, y en las condiciones de 6X durante 18 h, de 1000.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de SA-SUPER.

20

Tabla 6

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado SA-SUPER										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
35 °C	2X	3458	2359	1191	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,56	2,49	2,47
35 °C	4X	3049	1509	984	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,52	2,48	2,35
35 °C	6X	2944	1318	555	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,58	2,52	2,51
45 °C	2X	3650	1578	452	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,47	2,45	2,32
45 °C	4X	2852	763	254	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,53	2,48	2,36
45 °C	6X	2642	296	13	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,5	2,43	2,35

<Ejemplo 7>

Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado SX-PLUS

25 Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® SX-PLUS (en lo sucesivo SX-PLUS) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

30 Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 7]. A 25 °C, en las condiciones de SX-SUPER 6X, durante 18 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. A 35 °C 2X durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da y a 4x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 500.000 Da. A 45 °C 2X durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, a 4x durante 6 h, de 500.000 Da y a 6x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 10.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de SX-PLUS.

35

5

Tabla 7

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado SX-PLUS										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3268	2951	1854	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,48	2,41	2,39
25 °C	4X	3171	1795	899	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,50	2,47	2,33
25 °C	6X	3092	1426	599	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,49	2,46	2,41
35 °C	2X	3176	1966	945	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,51	2,46
35 °C	4X	2779	1271	559	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,48	2,41	2,39
35 °C	6X	2704	897	322	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,41	2,35	2,33
45 °C	2X	2897	1074	348	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,53	2,49	2,36
45 °C	4X	2673	519	144	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,45	2,38	2,36
45 °C	6X	2426	201	10	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,50	2,43	2,41

<Ejemplo 8>**Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado SX-1G**

Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® SX-1G (en lo sucesivo SX-1G) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular. Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 8]. A 35 °C, 6X durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y durante 18 h de 500.000 Da. A 45 °C 2X durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 500.000 Da, y a 6x durante 18 h, de 10.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de SX-1G.

20

Tabla 8

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado SX-1G										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
35 °C	2X	3529	2408	1241	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,48	2,46
35 °C	4X	3119	1540	757	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,50	2,47	2,43
35 °C	6X	3005	1099	427	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,56	2,51	2,50
45 °C	2X	3319	1315	471	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,52	2,48	2,36
45 °C	4X	2971	636	196	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,51	2,47	2,46
45 °C	6X	2696	247	14	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,50	2,48	2,40

<Ejemplo 9>**Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado SX-ULTRA**

Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® SX-ULTRA (en lo sucesivo SX-ULTRA) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 9]. A 25 °C, en las condiciones de SX-ULTRA 4X, durante 18 horas, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. A

30

35 °C 2X durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da y a 4x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 500.000 Da. A 45 °C 2X durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, a 4x durante 6 h, de 500.000 Da y a 6x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 10.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de SX-ULTRA.

Tabla 9

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado SX-ULTRA										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3268	2951	1854	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,48	2,41	2,39
25 °C	4X	3171	1795	899	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,50	2,47	2,33
25 °C	6X	3092	1426	599	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,49	2,46	2,41
35 °C	2X	3176	1966	945	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,51	2,46
35 °C	4X	2779	1271	559	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,48	2,41	2,39
35 °C	6X	2704	897	322	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,41	2,35	2,33
45 °C	2X	2897	1074	348	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,53	2,49	2,36
45 °C	4X	2673	519	144	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,45	2,38	2,36
45 °C	6X	2426	201	10	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,50	2,43	2,41

<Ejemplo 10>**Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado PAC-200C**

Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® PAC-200C (en lo sucesivo PAC-200C) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 10]. A 35 °C 6X durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. A 45 °C 2X durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 500.000 Da, a 4x durante 6 h, de 1.000.000 Da y a 6x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 10.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de PAC-200C.

Tabla 10

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado PAC-200C										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
35 °C	2X	3388	2311	1429	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,58	2,50	2,48
35 °C	4X	2988	1478	1279	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,49	2,39
35 °C	6X	2885	1100	721	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,60	2,53	2,52
45 °C	2X	3277	1893	542	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,48	2,46	2,37
45 °C	4X	2794	915	330	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,42	2,38	2,35
45 °C	6X	2589	355	15	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,50	2,38	2,33

<Ejemplo 11>**Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado DARCO KBB**

Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® DARCO RBB (en lo sucesivo PAC-200C) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 11]. A 25 °C, 4X durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 35 °C, la capacidad de descomposición aumentó de forma elevada y en el caso de 2x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y a 4x durante 18 h, de 500.000 Da. A 45 °C, 2x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 500.000 Da, a 4x durante 6 h, de 500.000 Da, y a 6X durante 18 h, de 10.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 92 % o superior en todas las condiciones de reacción de DARCO KBB.

Tabla 11

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado DARCO KBB										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3380	2500	1454	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,50	2,47	2,32
25 °C	4X	3448	2173	954	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,53	2,50	2,45
25 °C	6X	3380	1426	410	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,52	2,39	2,39
35 °C	2X	3311	1966	916	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,49	2,35
35 °C	4X	3448	1454	463	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,45	2,43	2,39
35 °C	6X	3380	994	123	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,51	2,45	2,38
45 °C	2X	3380	881	492	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,52	2,49	2,34
45 °C	4X	3378	473	120	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,47	2,41	2,39
45 °C	6X	3346	15	9	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,51	2,44	2,40

<Ejemplo 12>

Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular usando carbón activado DARCO A-51

Se usaron las condiciones de reacción del <Ejemplo 1> excepto carbón activado Norit® DARCO A-51 (en lo sucesivo PAC- A-51) en lugar de CA1 para llevar a cabo el análisis comparativo de productividad de ácido hialurónico de bajo peso molecular.

Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron la endotoxina, la concentración de ácido hialurónico, y el peso molecular promedio de acuerdo con el método de análisis. Los resultados se indican en la [tabla 12]. A 25 °C, 4X durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da. En el caso en que la reacción se llevó a cabo a 35 °C, la capacidad de descomposición aumentó de forma elevada y en el caso de 6x durante 6 h, se obtuvo ácido hialurónico de 1.000.000 Da, y durante 18 h, de 100.000 Da. A 45 °C, 2x durante 18 h, se obtuvo ácido hialurónico de 500.000 Da, a 4x durante 6 h, de 500.000 Da, y a 6X durante 18 h, de 10.000 Da. Los inventores confirmaron que la endotoxina fue menor de 0,5 EU/mg y se descubrió que el aumento de la temperatura de reacción es eficaz en la reducción adicional de la endotoxina al igual que los resultados obtenidos anteriormente. También, la concentración de ácido hialurónico se mantuvo en al menos un 93 % o superior en todas las condiciones de reacción de DARCO A-51.

tabla 12

Resultados después de la reacción de ácido hialurónico con carbón activado DARCO A-51										
Temp. de reacc.	Conc. de carbón activado	Pm, kDa			Endotoxina, EU/mg			g HA/l		
		3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h	3 h	6 h	18 h
25 °C	2X	3554	2527	1499	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,54	2,53	2,42
25 °C	4X	3390	2217	994	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,54	2,50	2,48
25 °C	6X	3345	1412	497	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,52	2,45	2,40

35 °C	2X	3311	1965	898	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,54	2,46	2,41
35 °C	4X	3276	1439	477	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,53	2,51	2,45
35 °C	6X	3307	916	125	< 0,05	< 0,05	< 0,05	2,52	2,49	2,42
45 °C	2X	3207	757	496	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,49	2,43	2,34
45 °C	4X	3173	402	127	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,45	2,37	2,31
45 °C	6X	3138	16	10	< 0,005	< 0,005	< 0,005	2,50	2,35	2,34

<Ejemplo 13>

Método de preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular derivado de la cresta de gallo

En el presente Ejemplo, el material de partida de ácido hialurónico de alto peso molecular se extrajo y purificó de la cresta de gallo, y su peso molecular promedio fue 3.500.000 Da.

En este experimento, se seleccionó carbón activado CA1 como ajustador de peso molecular, y a continuación los resultados experimentales del ácido hialurónico derivado de la cresta de gallo se compararon con los del ácido hialurónico derivado de microorganismo. A continuación, se describirá con detalle el experimento.

La concentración del material de partida de ácido hialurónico derivado de cresta de gallo se ajustó a 2,5g HAl. A continuación, el ácido hialurónico se introdujo en una cantidad de 300 ml en un vaso de precipitados de 1 l, y se introdujo carbón activado CA1 en el vaso de precipitados en una concentración dos veces, 4 veces y 6 veces mayor que la concentración de ácido hialurónico. A continuación, se hizo girar un impulsor (diámetro de 5 cm) hecho de teflón a una velocidad de 300 rpm. Con el fin de evitar al máximo la mezcla de impurezas o la evaporación del líquido de reacción hasta la finalización de la reacción, las partes del impulsor distintas de la parte de rotación del impulsor se cerraron herméticamente con una cubierta. La temperatura de reacción fue 25 °C.

Los resultados del ácido hialurónico derivado de la cresta de gallo como grupo de control se compararon con los del <Ejemplo 1>. Después de 3, 6, y 18 horas, se recogió cada muestra, y se analizaron los cambios. El cambio del peso molecular promedio del ácido hialurónico derivado de la cresta de gallo se indica en la [tabla 13].

Se descubrió que el ácido hialurónico derivado de la cresta de gallo se descompuso por el carbón activado CA1 de la misma manera que el ácido hialurónico derivado de microorganismo del <Ejemplo 1>. Esto indica que no existe ninguna diferencia en el proceso de disminución del peso molecular entre el material de partida derivado de microorganismo y el material de partida derivado de la cresta de gallo.

Tabla 13

Cambios del peso molecular del ácido hialurónico derivado de la cresta de gallo				
Origen del ácido hialurónico	Conc. de carbón activado	Pm, kDa		
		3 h	6 h	18 h
Microorganismo	CA1 2X	3519	2089	1485
Microorganismo	CA1 4X	3519	1485	994
Microorganismo	CA1 6X	3519	975	523
Cresta de gallo	CA1 2X	3381	1371	1015
Cresta de gallo	CA1 4X	3519	994	751
Cresta de gallo	CA1 6X	3314	653	455

<Ejemplo 14>

Método de producción de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 2.000.000 Da en un proceso industrial

En un fermentador de 1 t, se cultivó *Streptococcus* sp. ID9102(KCTC11395BP) en las mismas condiciones del medio de cultivo que se han descrito en el <Ejemplo 1> de modo que se obtuvieran 500 l de cultivo. Este cultivo se purificó de modo que se produjera una composición de 500 l. El peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 3.500.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue mucho mayor de 5,0 EU/mg.

Se seleccionó carbón activado como ajustador de peso molecular, y se introdujo en una cantidad 4 veces mayor que la de ácido hialurónico. La reacción de disminución del peso molecular se llevó a cabo en un reactor de 500 l revestido con Teflón, y la temperatura de reacción fue 45 °C. Después de 4 horas de reacción, se retiró el adsorbente y se finalizó la reacción. Después de la reacción, se midieron la concentración de ácido hialurónico del producto resultante, la concentración de endotoxina, y el peso molecular promedio del ácido hialurónico.

Como resultado, el peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 2.000.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue 0,005 EU/mg o inferior.

El filtrado de ácido hialurónico cuyo peso molecular se había disminuido se hizo precipitar y se secó de modo que

proporcionó 2 kg de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 2.000.000 Da.

<Ejemplo 15>

Método de producción de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 1.000.000 Da en un proceso industrial

Se prepararon 500 l de composición de ácido hialurónico en las mismas condiciones que se han descrito en el <Ejemplo 14>. El peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 3.500.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue mucho mayor de 5,0 EU/mg.

Las condiciones de reacción del carbón activado fueron las mismas que en el <Ejemplo 14>, y el tiempo de reacción fue 6 horas. Después de 6 horas de reacción, se retiró el adsorbente y se finalizó la reacción. Después de la reacción, se midieron la concentración de ácido hialurónico del producto resultante, la concentración de endotoxina, y el peso molecular promedio del ácido hialurónico.

Como resultado, el peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 1.000.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue 0,005 EU/mg o inferior.

El filtrado de ácido hialurónico cuyo peso molecular se había disminuido se hizo precipitar y se secó de modo que proporcionó 2 kg de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 1.000.000 Da.

<Ejemplo 16>

Método de producción de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 500.000 Da en un proceso industrial

Se prepararon 500 l de composición de ácido hialurónico en las mismas condiciones que se han descrito en el <Ejemplo 14>. El peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 3.500.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue mucho mayor de 5,0 EU/mg.

Las condiciones de reacción del carbón activado fueron las mismas que en el <Ejemplo 14>, y el tiempo de reacción fue 7 horas. Después de 7 horas de reacción, se retiró el adsorbente y se finalizó la reacción. Después de la reacción, se midieron la concentración de ácido hialurónico del producto resultante, la concentración de endotoxina, y el peso molecular promedio del ácido hialurónico.

Como resultado, el peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 500.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue 0,005 EU/mg o inferior.

El filtrado de ácido hialurónico cuyo peso molecular se había disminuido se hizo precipitar y se secó de modo que proporcionó 2 kg de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 500.000 Da.

<Ejemplo 17>

Método de producción de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 100.000 Da en un proceso industrial

Se prepararon 500 l de composición de ácido hialurónico en las mismas condiciones que se han descrito en el <Ejemplo 14>. El peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 3.500.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue mucho mayor de 5,0 EU/mg.

Las condiciones de reacción del carbón activado fueron las mismas que en el <Ejemplo 14>, y el tiempo de reacción fue 8 horas. Después de 8 horas de reacción, se retiró el adsorbente y se finalizó la reacción. Después de la reacción, se midieron la concentración de ácido hialurónico del producto resultante, la concentración de endotoxina, y el peso molecular promedio del ácido hialurónico.

Como resultado, el peso molecular promedio del ácido hialurónico fue 100.000 Da, la concentración de ácido hialurónico fue 5 g/l, y la concentración de endotoxina fue 0,005 EU/mg o inferior.

El filtrado de ácido hialurónico cuyo peso molecular se había disminuido se hizo precipitar y se secó de modo que proporcionó 2 kg de ácido hialurónico teniendo un peso molecular promedio de 100.000 Da.

A través del <Ejemplo 14> al <Ejemplo 17>, los presentes inventores desarrollaron un método para producir ácido hialurónico de bajo peso molecular de alta calidad, que es fácil de aplicar a escala industrial.

Aplicabilidad industrial

El método de la presente invención para disminuir el peso molecular de ácido hialurónico de alto peso molecular es un proceso conveniente sin los inconvenientes de reprocesar la retirada de materiales de alimentación, o requerir tratamiento de pH, diversos catalizadores de reacción, y condiciones de tratamiento adicionales complicadas (tales como tratamiento térmico) como en los métodos convencionales. Además, el método tiene el efecto de retirar impurezas. De ese modo, mediante el método, es posible producir de forma conveniente y económica ácido hialurónico de bajo peso molecular con una elevada pureza. El método de la invención para disminuir el peso molecular tiene la ventaja de que de acuerdo con el cambio de las condiciones de reacción usando carbón activado, el peso molecular del ácido hialurónico de bajo peso molecular se puede ajustar de forma diversa. El ácido hialurónico de bajo peso molecular producido mediante el método de la presente invención se puede producir de acuerdo con los estándares de los suministros médicos mientras se pueden mantener las características propias del ácido hialurónico. También, se puede producir de acuerdo con los estándares de los cosméticos y los alimentos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar ácido hialurónico de bajo peso molecular que comprende la etapa de poner en contacto el ácido hialurónico con carbón activado, en el que el carbón activado se usa como medio de reacción con el fin de convertir el ácido hialurónico de elevado peso molecular en ácido hialurónico de bajo peso molecular teniendo un peso molecular predeterminado y en el que el ácido hialurónico de elevado peso molecular es obtenido mediante cultivo de microorganismos o por extracción de la cresta de gallo.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la proporción de ácido hialurónico con respecto al carbón activado es de 1:2 a 1:6.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la temperatura para poner en contacto el ácido hialurónico con el carbón activado es de 25 °C a 45 °C, y el tiempo para poner en contacto el ácido hialurónico con el carbón activado es de 3 h a 18 h.

Fig. 1

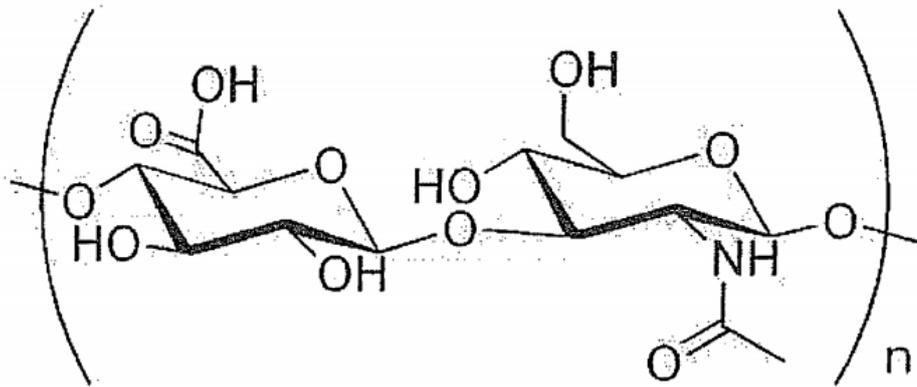


Fig. 3

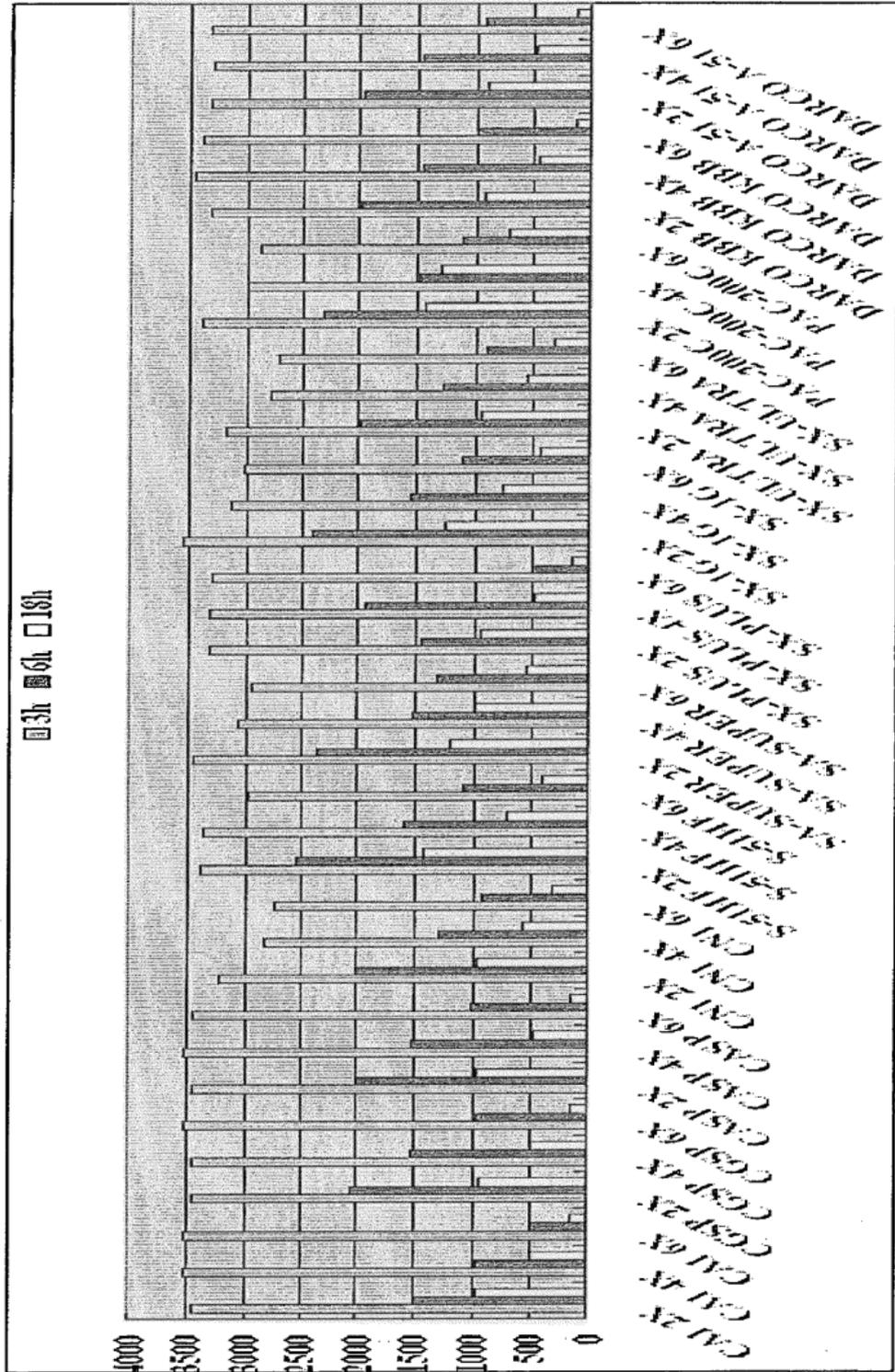
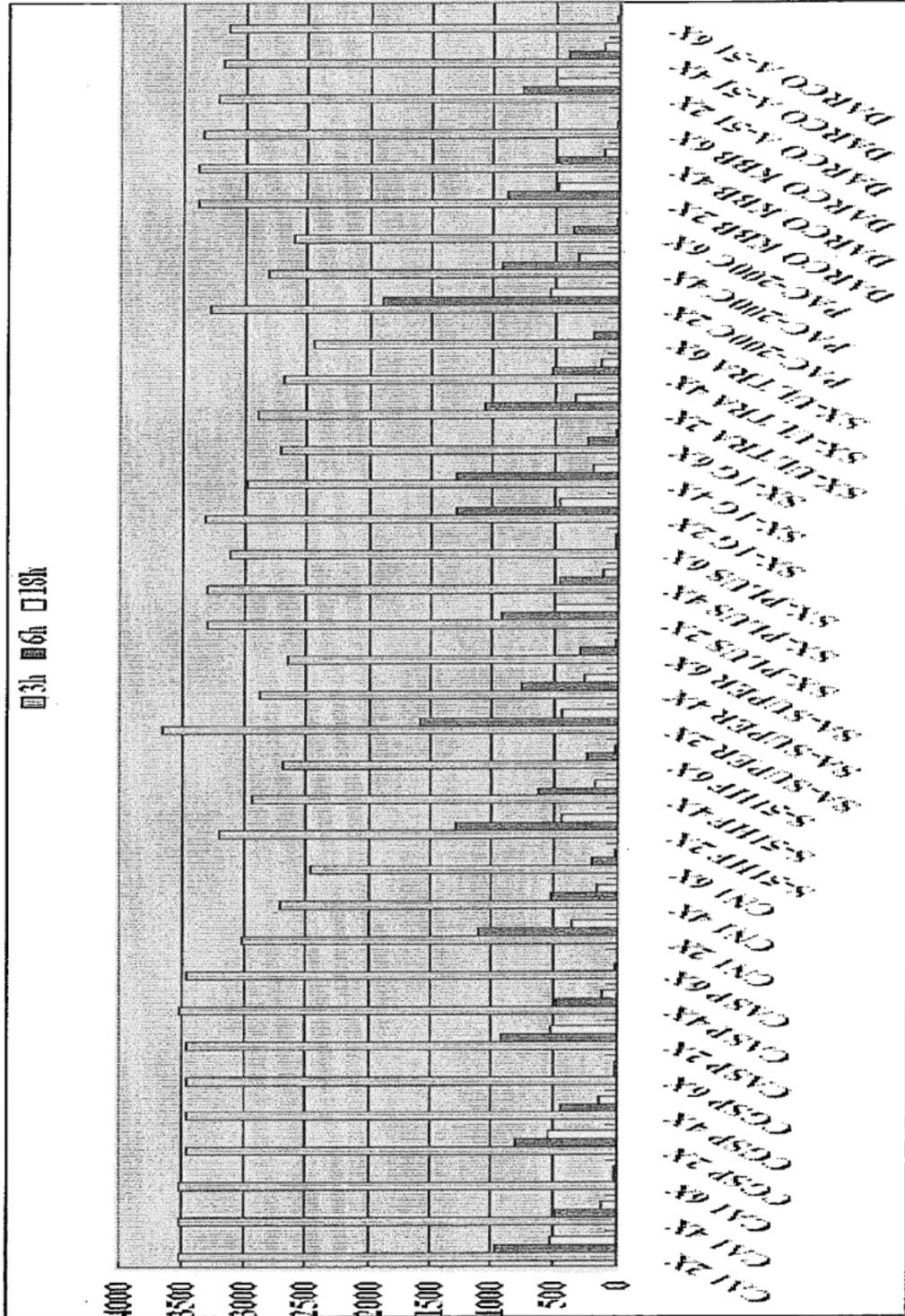


Fig. 4



DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

5 En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPO no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10
- KR 1020090087185 [0001]
 - JP 63057602 A [0008]
 - JP 1266102 A [0008]
 - CN 101020724 A [0008]
 - US 2009162905 A1 [0008]
 - JP 2245193 A [0009]
 - JP 2022301 A [0009]
 - KR 100369517 [0009]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- 15
- Y. TOKITA et al. *Polymer Degradation and Stability*, 1995, vol. 48, 269-273 [0008]
 - T. BITTER. *Anal. Biochem.*, 1962, vol. 4, 330-334 [0054]
 - NARLIN B. BEATY et al. *Anal. Biochem.*, 1985, vol. 147, 387-395 [0054]