

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 556**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)	C12R 1/07	(2006.01)
C12N 9/26	(2006.01)		
C12N 15/56	(2006.01)		
C12P 19/28	(2006.01)		
C07K 14/32	(2006.01)		
A61K 8/73	(2006.01)		
A61K 31/728	(2006.01)		
A61P 17/02	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
A61Q 17/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2012 PCT/CN2012/085503**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13123791**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012 E 12869142 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2818543**

54 Título: **Bacillus, enzima de ácido hialurónico y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.02.2012 CN 201210039111
13.04.2012 CN 201210108194

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2018

73 Titular/es:

BLOOMAGE FREDA BIOPHARM CO., LTD.
(100.0%)
No.678 Tianchen Street, Hi-Tech Development
Zone, Jinan
Shandong 250101, CN

72 Inventor/es:

GUO, XUEPING;
SHI, YANLI;
QIAO, LIPING;
FENG, NING;
WANG, GUANFENG;
LI, HAINA;
XUE, WEI;
WANG, HAIYING;
LUAN, YIHONG y
LIU, AIHUA

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 665 556 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

Bacillus, enzima de ácido hialurónico y usos de los mismos

5 **Campo técnico**

10 [0001] La presente invención se refiere a los campos de la enzimología y química farmacéutica, y se refiere a una especie bacillus, una hialuronidasa, y usos de los mismos. La presente invención se refiere además a un procedimiento para preparar un ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo o un ácido hialurónico de bajo peso molecular o sales del mismo, y los usos de la especie bacillus, hialuronidasa, ácido hialurónico oligomérico o sales de los mismos, ácido hialurónico de bajo peso molecular o sales del mismo.

Técnica anterior

15 [0002] El ácido hialurónico (HA) es un mucopolisacárido ácido, un glicosaminoglicano de alto peso molecular no ramificado que consiste en unidades de repetición de disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico, y existe en las sustancias intercelulares de los tejidos animales o en la cápsula de alguna las bacterias. El ácido hialurónico se utiliza ampliamente en medicinas, cosméticos y alimentos, y por lo general tiene un peso molecular de $10^5 - 10^7$ Da (Dalton).

20 [0003] El ácido hialurónico oligomérico se refiere al ácido hialurónico con un peso molecular de menos de 10k Da. Las investigaciones muestran que el peso molecular influye notablemente en la actividad del ácido hialurónico y ácidos hialurónicos con diferentes pesos moleculares pueden tener actividades completamente invertidas (GUO, Xueping, et al, Low-molecular-weight and Oligomeric hyaluronic acids. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2003, 24 (3): 148-150).

25 [0004] Las investigaciones muestran que el ácido hialurónico oligomérico tiene la actividad de promover la angiogénesis in vivo, así como la actividad de promover la proliferación de células endoteliales in vitro, y puede promover la cicatrización de heridas (West DC, Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. Exp Res 1989, 183 (1): 179-96). Los hialuronatos oligoméricos tienen la actividad biológica de promoción de la angiogénesis, la promoción de la cicatrización de heridas, y poseen una buena perspectiva de aplicación en los campos de la medicina y farmacia (véanse por ejemplo los documentos US 2007/0202570 A1; WO 00/38647 A1, US 2011/0130339 A1). Durante el procedimiento inflamatorio, el ácido hialurónico oligomérico tiene un efecto de activación potente sobre células inmunocompetentes, tales como células dendríticas y macrófagos (Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. J Exp Med. 2002, 195 (1): 99-111).

35 [0005] In vitro, el ácido hialurónico oligomérico puede inhibir el crecimiento de las células de cáncer de mama TA3/St de ratones, células de neuroglioma CG de rata, células tumorales de clon HCT humano y células de cáncer de pulmón LXI humano, y tiene funciones antitumorales (Ghatak S, Misra S., Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. J Biol Chem 2005, 280 (10): 8875-83).

40 [0006] Además, los grupos hidroxilo, grupos carboxílicos y otros grupos polares en hialuronatos oligoméricos pueden formar enlaces de hidrógeno con moléculas de agua con el fin de unirse a una gran cantidad de agua, teniendo de ese modo un efecto significativo de retención de agua. Por lo tanto, los hialuronatos oligoméricos se pueden utilizar en cosméticos para la protección solar, antienvjecimiento e hidratantes.

45 [0007] En la actualidad, los procedimientos para la degradación del ácido hialurónico se dividen principalmente en tres grupos: degradación física, degradación química y degradación biológica. Los procedimientos de degradación física difícilmente pueden degradar el ácido hialurónico a 10k Da o por debajo. Aunque los procedimientos de degradación química y los procedimientos enzimáticos pueden preparar ácido hialurónico oligomérico, los procedimientos de degradación química necesitan condiciones de reacción rigurosas (por ejemplo, concentraciones elevadas de bases y ácidos) para alcanzar el máximo grado de degradación en la preparación de ácido hialurónico oligomérico. En este momento, los enlaces glucosídicos de la cadena de sacárido se rompen, y la estructura de residuos de monosacárido (ácido glucurónico y acetilglucosamina) se rompe también, por ejemplo, la eliminación de grupos acetilo por hidrólisis y la rotura del anillo de 6 miembros de monosacárido (la manifestación es la inconsistencia en el espectrograma infrarrojo en comparación con el espectro estándar de la Farmacopea Europea), que tienen efectos sobre la actividad biológica del ácido hialurónico oligomérico obtenido (GUO Xueping, et al, Low-molecular-weight and Oligomeric Hyaluronic Acid, Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2003, 24 (3): 148-150). Los ácidos hialurónicos oligoméricos preparados por procedimientos de degradación química son propensos a volverse marrones (Solicitud de Patente China No. 201110008110.9), y el procedimiento de producción de los mismos puede contaminar el medio ambiente. Cuando el ácido hialurónico se prepara por procedimientos enzimáticos, sólo se rompen los enlaces glucosídicos entre monosacáridos y no se rompen otras estructuras. Además, los procedimientos enzimáticos emplean condiciones de reacción moderadas, y

no utilizan ácidos fuertes y bases fuertes. Los ácidos hialurónicos oligoméricos obtenidos no son propensos a volverse marrones, se evita la contaminación ambiental, y los ácidos hialurónicos oligoméricos preparados por procedimientos enzimáticos tienen una estructura integral y el espectro infrarrojo de los mismos es consistente con el espectro estándar de la Farmacopea Europea. De este modo, los procedimientos enzimáticos son los más adecuados para la preparación de ácido hialurónico oligomérico.

[0008] Las enzimas utilizadas para la degradación de ácido hialurónico son principalmente hialuronidasas, que pueden dividirse en 3 grupos según sus mecanismos: (1) endo- β -N-acetilglucosaminidasa, una hidrolasa y actúa sobre un enlace β -1,4-glucosídico, los principales productos son tetrasacáridos, puede actuar sobre condroitina o sulfato de condroitina y tiene actividad transglucosidasa; (2) hialuronidasa derivada de hirudo o anquilostomiasis, es una endo- β -glucuronidasa, actúa sobre el enlace β -1,3-glucosídico, es también una hidrolasa, los principales productos de degradación son tetrasacáridos, puede degradar específicamente el ácido hialurónico; (3) hialuronidasa bacteriana, que también se denomina hialuronato liasa, actúa sobre el enlace β -1,4-glucosídico, y produce disacáridos 4,5-insaturados a través de un mecanismo de β -eliminación (Kreil, G, Hyaluronidasas – a group of neglected enzymes, Protein Sci, 1995, 4 (9): 1666-1669).

[0009] En la actualidad, los procedimientos para la producción industrial de ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo son procedimientos de degradación química. Dado que las fuentes de tejidos animales que contienen hialuronidasa son limitadas, algunos informes muestran que los caldos de fermentación de hialuronidasa de origen microbiano tienen una actividad enzimática más baja por unidad, y la actividad enzimática máxima de los caldos de fermentación es $1,3 \times 10^2$ UI/ml (WO2010130810A1; Eileen Ingham, K.T. Holland, G. Gowland y W.J. Cunliffe, Purification and Partial Characterization of Hyaluronate Lyase (EC4.2.2.1) from Propionibacterium acnes, Journal of General Microbiology (1979), 115,411-418), otros informes muestran una actividad de la enzima menor que 100 UI/ml, y la hialuronidasa no puede ser producida a gran escala, y así el ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo no se pueden producir a gran escala por procedimientos enzimáticos.

[0010] Además, el ácido hialurónico con un peso molecular de 10^4 Da – 10^6 Da se denomina habitualmente como ácido hialurónico de bajo peso molecular (LMW-HA). LMW-HA con un peso molecular de 20.000-60.000 puede estimular la proliferación de células óseas cultivadas in vitro, aumentar el número de colonias de células óseas y el área de colonias individuales en medios culturales (US 5.646.129). Mediante el uso de gotas para los ojos que contienen tobramicina y HA con un peso molecular de 500.000 en el tratamiento de queratohelcosis bacteriana, el tiempo de curación se acortó significativamente en comparación con gotas para los ojos que contenían sólo tobramicina (Gandolfi SA, Massari A, Orsoni JG. Low-molecular-weight sodium hyaluronate in the treatment of bacterial corneal ulcers s[J] Graefes Arco Clin Exp Ophthalmol, 1992, 230 (1): 20-23.). La patente de Corea (KR20080087941) proporciona una composición de HA con un peso molecular de menos de 100.000, la composición es propensa a la absorción en el cuerpo humano, y la administración oral de la misma puede eliminar eficazmente las arrugas de la piel y mejorar la elasticidad de la piel. La patente japonesa (JP2000-103723) proporciona una composición que contiene HA con un peso molecular de 200.000-400.000, la composición puede promover el crecimiento del cabello. Sin embargo, similar al ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo, el LMW-HA o sales del mismo, tal como se preparan por procedimientos de degradación enzimática, son más integrales en la estructura que los preparados por procedimientos químicos, y LMW-HA o sales del mismo, tal como se han preparado mediante procedimientos químicos, pueden tener apertura de anillo y desacetilación en su estructura.

[0011] El LMW-HA tiene un peso molecular relativo más pequeño, y por lo tanto puede ser bien absorbido por la piel en uso externo, promueve el suministro de nutrientes a la piel y la excreción de residuos, para prevenir el envejecimiento de la piel, lograr una hidratación profunda y mantener la belleza, promover la proliferación y diferenciación de las células epiteliales, atrapar radicales libres, así como reparar lesiones en la piel causadas por la luz del sol o la luz ultravioleta. El LMW-HA oral es propenso a la absorción, puede activar células de la piel, mantener la humedad de la piel y a la vez proporcionan una función de mejora del sistema inmunitario y la función antienviejecimiento. Por lo tanto, el HA utilizado en cosméticos y alimentos para la salud son por lo general de LMW-HA. Además, el LMW-HA también puede promover la angiogénesis, la activación de la inmunidad celular y la osteogénesis, tiene buenos efectos terapéuticos en el tratamiento de queratohelcosis bacteriana, y por lo tanto es ampliamente utilizado en el campo de la medicina.

[0012] El LMW-HA se obtiene mediante la degradación de HA de alto peso molecular, y los procedimientos de degradación son principalmente 3 grupos, es decir, la degradación física, la degradación química, y la degradación biológica. Aunque el procedimiento de degradación por ultrasonidos como procedimiento de degradación física está libre de agentes químicos y enzimas, difícilmente puede degradar el HA de alto peso molecular para alcanzar un peso molecular de 200k Da o por debajo (QIN Caifeng, WANG Miao, CHEN Xiaofeng, Studying of Degradation Methods and Process Conditions of Hyaluronic Acid, [J] 2007, 4: 32-36). El procedimiento mecánico de molienda es también un procedimiento eficaz para reducir el peso molecular relativo de HA. Una patente describe que el tiempo de molienda a temperatura ambiente es de 0,5 h-12 h, la frecuencia de oscilación es de 10 Hz-30 Hz, pero no es adecuado para la producción a gran escala

(CN101942037A). Un procedimiento de degradación química puede romper la estructura, que puede romper no sólo los enlaces glucosídicos de la cadena de sacárido, sino también la estructura de residuos de monosacárido (ácido glucurónico y acetilglucosamina) los residuos, por ejemplo, los grupos acetilo son eliminados por hidrólisis y se rompe el anillo de 6 miembros de monosacárido.

5

[0013] Algunos informes muestran un procedimiento para preparar HA de bajo peso molecular mediante un procedimiento de degradación enzimática, en el que el HA en primer lugar se aísla y purifica del caldo de fermentación, a continuación, se añade hialuronidasa para la degradación enzimática, a continuación la filtración de membrana, precipitación con etanol, deshidratación y secado para obtener el HA de bajo peso molecular (CN101020724A), la hialuronidasa utilizada en el procedimiento es un producto terminado de hialuronidasa, que es muy caro y difícilmente se puede utilizar para la producción industrial. En la actualidad, algunos informes muestran caldos de fermentación de hialuronidasa de origen microbiano que tienen actividad enzimática más baja por unidad, la actividad máxima de la enzima de los caldos de fermentación es $1,3 \times 10^2$ UI/ml (WO2010130810A1), otros informes muestran una actividad enzimática menor que 100 UI/ml, por lo tanto, en la actualidad, el HA de bajo peso molecular HA difícilmente puede producirse a gran escala mediante procedimientos enzimáticos.

15

Contenido de la invención

20

[0014] Los inventores han hecho esfuerzos en una investigación profunda y trabajo de la invención y de este modo obtuvieron un bacillus, así como una hialuronidasa. La hialuronidasa tiene una alta actividad de hasta 10^5 UI/ml (caldo de fermentación), y 8×10^6 - $1,5 \times 10^7$ UI/mg después de la purificación, que son mucho mayores que la actividad enzimática más alta, tal como se describió en los documentos actuales. La hialuronidasa tiene un peso molecular de 123 kDa, una temperatura más adecuada de 42°C y un pH más adecuado de 6,5, y tiene buena estabilidad térmica y estabilidad al pH. La enzima puede catalíticamente romper el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina, pero no puede degradar el alginato de sodio, heparina sódica, quitosano, quitina y carboximetilcelulosa sódica. Tiene velocidad de reacción alta, condiciones de reacción moderadas, menos contaminación del medio ambiente cuando se utiliza la hialuronidasa para degradar el ácido hialurónico de alto peso molecular, por lo que es adecuado para la producción industrial de ácido hialurónico de bajo peso molecular y ácido hialurónico oligomérico a gran escala, y también se puede utilizar para la producción de sulfato de condroitina de bajo peso molecular (en la presente invención, cuando se hace referencia al sulfato de condroitina con un peso molecular de 1000-10000, también se llama como sulfato de condroitina LMW). La hialuronidasa obtenida en la presente invención mediante el uso de bacillus en la fermentación es útil en la degradación del ácido hialurónico de alto peso molecular o sales del mismo, que muestra una alta actividad de enzima, con condiciones moderadas, simple en su funcionamiento y libre de contaminación del medio ambiente; además, el ácido hialurónico oligomérico obtenido o sales del mismo o ácido hialurónico de bajo peso molecular o sales del mismo tienen una estructura integral, y están libres de amarronamiento. Por lo tanto, se proporciona la siguiente invención.

35

[0015] Un aspecto de la presente invención se refiere a una especie bacillus, que tiene un número de acceso de depósito de CGMCC NO. 5744, fecha del depósito del 8 de febrero de 2012, y el nombre de la institución depositaria de China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC).

40

[0016] Con el fin de superar los inconvenientes, tales como baja actividad enzimática, la limitación de la fuente y el alto coste en la degradación biológica de ácido hialurónico o sales del mismo de la técnica anterior, los inventores habían aislado del aire un bacillus (especie bacillus) A50 que produce hialuronidasa y esta cepa se ha depositado en la China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC) con el número de acceso de depósito de CGMCC NO. 5744, y la fecha de depósito del 8 de febrero de 2012.

45

[0017] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de hialuronidasa que comprende la etapa de usar el bacillus de la presente invención; específicamente, que comprende las siguientes etapas: someter el bacillus de la presente invención a un cultivo en pendiente, cultivo de siembra, cultivo de fermentación, centrifugación, precipitación fraccionada con sulfato de amonio, ultrafiltración, para obtener una hialuronidasa.

50

[0018] El procedimiento para la preparación de hialuronidasa de acuerdo con una cualquiera de los puntos de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- (1) someter el bacillus de la presente invención a cultivo en pendiente para obtener una cepa en pendiente;
- (2) inocular la cepa en pendiente en un medio de cultivo de siembra esterilizado, y cultivar en condiciones de 25°C – 40°C, 100-200 rpm durante 10 a 24 horas, para obtener una solución de siembra;
- (3) inocular la solución de siembra en un medio de cultivo de fermentación esterilizado, y cultivar en condiciones de 25°C – 40°C, 100-300 rpm durante 12 a 24 horas, para obtener un caldo de fermentación de hialuronidasa;
- (4) separar el caldo de fermentación por centrifugación para obtener un sobrenadante;
- (5) someter el sobrenadante a precipitación fraccionada con sulfato de amonio, filtración (por ejemplo, filtración utilizando membrana de microfiltración de 0,65 µm), para obtener una hialuronidasa en bruto;

60

(6) disolver la hialuronidasa en bruto precipitada en la etapa (5) en una solución tampón de fosfato, eliminar las impurezas moleculares pequeñas por ultrafiltración, para obtener una hialuronidasa purificada.

[0019] Opcionalmente, la etapa (6) puede llevarse a cabo mediante las etapas siguientes (6-1) a (6-3):

5 (6-1): disolver la hialuronidasa en bruto de la etapa (5) en una solución tampón con pH 4,5-8,0 para obtener una solución de enzima en bruto; cargar la solución de enzima en bruto en una bolsa de diálisis con un corte molecular de $3,0 \times 10^3 - 1,4 \times 10^4$ Da, colocar en una solución tampón con un pH de 4,5-8,0, dializar a 4°C durante la noche;

10 (6-2): someter la solución de enzima en bruto dializada a separación por cromatografía de intercambio iónico, en la que se utiliza un relleno de la columna de cromatografía de medio FF-gel de agarosa-DEAE y una solución de NaCl 0-0,5 M para la elución en gradiente, y recoger los picos de elución;

(6-3): someter la muestra de hialuronidasa obtenida en la etapa (6-2) a una liofilización al vacío para obtener un polvo blanco como hialuronidasa.

15 **[0020]** Las etapas (6-1) a (6-3) son para purificar adicionalmente la hialuronidasa.

[0021] En el procedimiento anterior para la separación y purificación de la hialuronidasa, la hialuronidasa obtenida en la etapa (6-2) tiene una pureza del 97% o más medida por electroforesis en SDS-PAGE.

20 **[0022]** En la etapa anterior (1), por cada 100 ml de medio de cultivo en pendiente, se contienen los siguientes componentes: 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5-1,5 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; pH se ajusta a 6,0-8,0, temperatura de cultivo en pendiente es 25°C-40°C.

25 **[0023]** En la etapa anterior (2), por cada 100 ml de medio de cultivo de siembra, se contienen los siguientes componentes: 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5-1,5 g de glucosa; pH se ajusta a 6,0-8,0.

30 **[0024]** En la etapa anterior (3), por cada 100 ml de medio de cultivo de fermentación, se contienen los siguientes componentes: 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5-1,5 g de glucosa, 0,05 ml de Tween 80; pH se ajusta a 6,0-8,0.

[0025] Uno o más de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico se utilizan para ajustar el pH del medio de cultivo en pendiente, medio de cultivo de siembra y medio de cultivo de fermentación.

35 **[0026]** La cantidad de inoculación el cultivo en pendiente, cultivo de siembra y fermentación se puede obtener en la técnica anterior sin trabajo inventivo. La cantidad de inoculación para el medio de cultivo de siembra es suficiente para obtener la cantidad de inoculación de la solución de siembra para cultivo de fermentación, y la cantidad de inoculación para el medio de cultivo de fermentación es generalmente de 3%-15%.

40 **[0027]** En la etapa anterior (4), la velocidad de rotación de la centrifugación del caldo de fermentación es de 10000-15000 rpm, y el tiempo de centrifugación es de 10-20 minutos.

45 **[0028]** En la etapa anterior (5), la precipitación fraccionada con sulfato de amonio comprende las siguientes etapas: añadir al sobrenadante sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración de 20% p/v-25% p/v, extraer el precipitado generado por filtración, a continuación, añadir continuamente sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración de 35%-40% p/v, para obtener un precipitado como hialuronidasa. En la presente invención, la "concentración p/v" se refiere a: masa (g) de sulfato de amonio por ml del sobrenadante.

50 **[0029]** En la etapa anterior (6), la solución de tampón de fosfato tiene un pH de preferiblemente 6,0, concentración preferiblemente de 50 mmol/L, que puede cambiar según las circunstancias en la práctica. La ultrafiltración utiliza membrana de ultrafiltración. La membrana de ultrafiltración tiene un corte molecular de 3×10^4 Da.

[0030] Además otro aspecto de la presente invención se refiere a una hialuronidasa, que se obtiene por el procedimiento de preparación de hialuronidasa de acuerdo con una cualquiera de los puntos anteriores.

55 **[0031]** La hialuronidasa tal como se produce por el bacillus de la presente invención tiene una actividad enzimática de hasta $1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ UI/ml en caldo de fermentación, que es mucho mayor que la actividad enzimática más alta ($1,3 \times 10^2$ UI/ml) descrita, y la enzima tiene alta estabilidad térmica y estabilidad con el pH. Cuando se utiliza para degradar el ácido hialurónico de alto peso molecular para producir ácido hialurónico oligomérico o de bajo peso molecular, el coste se reduce significativamente, y se puede utilizar para la producción a gran escala. Por lo tanto, el problema del alto coste de la hialuronidasa derivada de animales está resuelto. Es prometedor en la aplicación en investigaciones biológicas y la producción de ácido hialurónico oligomérico o de bajo peso molecular.

- [0032]** La presente invención se refiere además a un polipéptido (o proteína) aislado, del cual se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2; específicamente, el polipéptido (o proteína) es hialuronidasa.
- 5 **[0033]** La presente invención se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2; específicamente, el polinucleótido es la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 3 o la secuencia complementaria de la SEQ ID NO: 3.
- 10 **[0034]** La presente invención se refiere además a un vector recombinante que comprende el polinucleótido de la presente invención.
- [0035]** La presente invención se refiere además a una célula huésped que comprende el vector recombinante de la presente invención.
- 15 **[0036]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico, que comprende la etapa de degradar el ácido hialurónico o sales del mismo con un peso molecular mayor que 10k Da mediante el uso de la hialuronidasa de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención o el caldo de fermentación que contiene la hialuronidasa de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención.
- 20 **[0037]** El procedimiento para preparar ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico de acuerdo con la presente invención, comprende las siguientes etapas:
 1) preparación de la solución de ácido hialurónico o sales del mismo: adición de ácido hialurónico o sales del mismo con un peso molecular mayor que 10k Da a agua purificada, para obtener una solución con una concentración de 1% p/v-30% p/v;
 2) enzimólisis: ajuste de la temperatura de la solución de la etapa 1) a 20°C-48°C, pH a 4-9, a continuación, adición de hialuronidasa de bacillus a la solución, degradación del ácido hialurónico o sales del mismo hasta un peso molecular deseado, para obtener una solución de enzimólisis;
 3) inactivación: mantenimiento de la solución de enzimólisis a 50°C-90°C durante 10-60 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus;
 30 preferiblemente, que comprende además las etapas siguientes:
 4) filtración: adición de una sal inorgánica soluble al inactivado p/v, agitación hasta que esté completamente disuelta, a continuación, filtración con membrana de filtración de 0,45 µm para obtener un filtrado, en el que por cada 100 ml de hidrolizado enzimático, se añaden 0,1-10 g de la sal inorgánica soluble;
 35 5) precipitación: mezclado uniforme del filtrado de la etapa 4) con alcohol o cetona en 3-20 veces el volumen del filtrado para precipitar el hialuronato oligomérico;
 6) deshidratación y secado: separar el precipitado de hialuronato oligomérico de la etapa 5), deshidratación con un disolvente orgánico, a continuación, secado al vacío, para obtener el hialuronato oligomérico.
- 40 **[0038]** El procedimiento para la preparación de ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico según la presente invención, en el que en la etapa 1), por cada 1 kg de ácido hialurónico o sales del mismo, se añaden 2×10^7 - 5×10^7 UI de hialuronidasa de bacillus.
- 45 **[0039]** El procedimiento para la preparación de ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico de acuerdo con la presente invención, en el que en la etapa 2), la temperatura para la enzimólisis es 35°C-45°C, el pH para la enzimólisis es de 5,5 a 7,5, y el ácido hialurónico se enzimoliza para tener un peso molecular mayor que o igual a 3000Da, y menos de 10^4 Da.
- 50 **[0040]** El procedimiento para preparar ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico de acuerdo con la presente invención satisface uno o más de los siguientes puntos A-F:
 A. en la etapa 1), el hialuronato se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio y sal de zinc del ácido hialurónico;
 B. en la etapa 2), se utiliza un ácido o una base para ajustar el pH a 4-9, dicho ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, dicha base es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio;
 55 C. en la etapa 3), la solución de enzimólisis se mantiene a 55°C-65°C durante 20-30 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus;
 D. en la etapa 4), dicha sal inorgánica soluble se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de zinc y sal de magnesio; preferiblemente, es cloruro, sulfato o nitrato de sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio;
 60 E. en la etapa 5), dicho alcohol o cetona es etanol, acetona, metanol, propanol, o isopropanol;

F. en la etapa 6), el disolvente orgánico usado para deshidratar es cetona o alcohol.

5 **[0041]** En el procedimiento anterior, la actividad específica de la hialuronidasa de bacillus utilizada es decir, la hialuronidasa purificada obtenida por fermentación de bacillus (especie bacillus) A50 CGMCC NO. 5744 es 8×10^6 - $1,5 \times 10^7$ UI/mg, y la cantidad de enzima que se añade por kg de ácido hialurónico o sales del mismo es 2×10^7 - 5×10^7 UI. La hialuronidasa tiene una buena actividad de degradación a ácido hialurónico, y el ácido hialurónico con cualquier peso molecular pequeño se puede obtener mediante la adición de una cantidad adecuada de la hialuronidasa, de modo que durante la enzimólisis, el ácido hialurónico con un peso molecular deseado puede obtenerse mediante el control de la longitud del período de tiempo.

10 **[0042]** Además, la etapa 4) utiliza membrana de filtración para filtrar el hidrolizado enzimático a fin de eliminar impurezas, tales como hialuronidasa, y mejorar la pureza de la producción. La membrana de filtración es una membrana de filtración común en la técnica anterior, siempre que cumpla con los requisitos de diámetro de poro de la presente invención. El diámetro de poro de la membrana de filtración es $0,45 \mu\text{m}$, y el material de la misma puede ser ésteres de celulosa, polisulfonas, o poliamidas.

15 **[0043]** En la anterior etapa 6), el disolvente orgánico usado para deshidratar es un disolvente orgánico mutuamente solubles con agua; preferiblemente, el disolvente orgánico es cetona o alcohol, y lo más preferiblemente, etanol y/o acetona. Sin estar limitado por ninguna teoría, se añade dicho disolvente orgánico a hialuronato oligomérico precipitado para eliminar la mayoría del agua en el precipitado.

20 **[0044]** El procedimiento para preparar ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo de la presente invención es simple en funcionamiento, con condiciones moderadas, sin romper la estructura de los productos, libre de contaminación del medio ambiente, de bajo coste en la hialuronidasa derivada de fermentación, adecuado para la producción industrial a gran escala, y el hialuronato oligomérico preparado tiene estructura integral, buena absorción transdérmica, alta pureza, sin citotoxicidad, fuerte capacidad antioxidante, y pueden ser ampliamente utilizados en cosméticos, alimentos y medicamentos. El procedimiento anterior permite obtener un ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico. Además se puede obtener un ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico, que tiene un disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico en una cantidad de $\geq 65\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ (p/p); específicamente, la cantidad de disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico se mide mediante el procedimiento de HPLC. Más específicamente, las condiciones de HPLC son las siguientes: utilizar una columna de análisis de sacáridos para llevar a cabo una medición de cromatografía líquida de alto rendimiento; fase móvil es una solución de $0,4 \text{ mol/l NaH}_2\text{PO}_4$; velocidad de flujo es $0,6 \text{ ml/min}$; temperatura de la columna es 35°C ; longitud de onda de detección es 232 nm ; y tamaño de la muestra es $20 \mu\text{l}$.

35 **[0045]** Por ejemplo, se pueden utilizar las siguientes etapas:
a. solución de control estándar: peso de una cantidad de control estándar (sal de sodio ΔDiHa de disacárido de ácido hialurónico, H9649, Sigma), disolución con solución de tampón fosfato (pH 6,0, 5 mmol/l) para formular una solución de 1 mg/ml , y obtener así la solución de control estándar;

40 b. pretratamiento de la muestra: peso de una cantidad de muestra a ensayar (preparada mediante los Ejemplos Comparativos 1-7, Ejemplos 13-26), disolución con solución de tampón fosfato (pH 6,0, 5 mmol/l) para formular una solución de 1 mg/ml . Se añade 1 ml de solución de muestra con 1000 UI de hialuronidasa (puede prepararse mediante los Ejemplos 10-12), se somete a baño de agua a 42°C durante 2 h ; después de enzimólisis, la solución de enzimólisis se pone a ebullición durante 2 minutos para inactivar la enzima, y de este modo se obtiene una solución de enzimólisis de la muestra.

45 La solución de enzimólisis de la muestra se transfiere a un matraz volumétrico de 20 ml , se añade con fase móvil a escala, se mezcla uniformemente, y se filtra para obtener una solución a ensayar.

c. tratamiento de la solución de control estándar: 1 ml de solución de control estándar se diluye con fase móvil 20 veces , y se filtra para el uso en espera.

50 d. condiciones de cromatografía: utilización de columna de análisis de sacáridos para llevar a cabo una medición de cromatografía líquida de alto rendimiento; fase móvil es una solución de $0,4 \text{ mol/l NaH}_2\text{PO}_4$; velocidad de flujo es $0,6 \text{ ml/min}$; temperatura de la columna es 35°C ; longitud de onda de detección es 232 nm ; y tamaño de la muestra es $20 \mu\text{l}$;

55 e. cálculo de resultados: usando cromatografía líquida de alto rendimiento para realizar la separación de cromatografía de control estándar y de la muestra a ensayar, y el cálculo del área del pico de disacárido de ácido hialurónico mediante un procedimiento estándar externo; específicamente, usando la siguiente fórmula para calcular el contenido de ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo (expresada en el contenido de disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico):

[0046] El contenido de ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo:

60
$$C (\%) = \frac{A_x \times C_R \times 100}{\dots} \times 100\%$$

$$A_x \times W_x \times (100-h)$$

A_x : área del pico del disacárido de ácido hialurónico de la muestra a ensayar;

A_R : área del pico del disacárido de ácido hialurónico del control estándar;

W_x : cantidad de la muestra a ensayar, mg;

C_R : concentración de la solución de control estándar, mg/ml;

h (%) es la pérdida por secado de la muestra a ensayar.

5
10 **[0047]** Un procedimiento específico también se puede leer en la solicitud de patente china, con número de publicación de CN102323344A, cuyos contenidos se incorporan en la presente invención por referencia.

15 **[0048]** En cuanto al ácido hialurónico oligomérico o el hialuronato oligomérico, su contenido tal como se mide por el procedimiento de HPLC y su contenido medido por el procedimiento de carbazol presentan una diferencia de menos del 1%.

20 **[0049]** El ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico obtenido tiene un peso molecular mayor que o igual a 3000 Da, y menos de 10^4 Da. Específicamente, el ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico se prepara mediante el procedimiento de enzimólisis (procedimiento de digestión con enzimas); mediante el uso de hialuronidasa de la presente invención.

25 **[0050]** El hialuronato oligomérico es un polvo o gránulos blancos, su contenido es mayor que el 95%, y su solución acuosa al 0,1% tiene un pH de 6-8. Su espectro de infrarrojos está en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea, su propiedad es buena y su estructura no está rota.

30 **[0051]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular, que comprende la etapa de degradar el ácido hialurónico o sales del mismo con un peso molecular superior a 1000 kDa usando la hialuronidasa de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención o el caldo de fermentación que contiene la hialuronidasa de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención.

35 **[0052]** El procedimiento para preparar ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención, comprende las siguientes etapas:

1) preparación de la solución de ácido hialurónico o sales del mismo: adición de ácido hialurónico o sales del mismo con un peso molecular mayor que 1000 kDa a agua purificada para obtener una solución con una concentración de 0,1% p/v-2% p/v;

2) enzimólisis: ajuste de la temperatura de la solución de la etapa 1) a 20°C-48°C, pH a 4-9, a continuación, adición de hialuronidasa de bacillus a la solución, degradación del ácido hialurónico o sales del mismo hasta un peso molecular deseado, para obtener una solución de enzimólisis;

3) inactivación: mantenimiento de la solución de enzimólisis a 50°C-90°C durante 10-60 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus;

preferiblemente, que comprende además las etapas siguientes:

4) filtración: adición de una sal inorgánica soluble a la solución de enzimólisis inactivada, agitación hasta que esté completamente disuelta, a continuación, filtración con membrana de filtración de 0,45 μ m para obtener un filtrado, en el que por cada 100 ml de $^\circ$ C, se añaden 0,1-10 g de la sal inorgánica soluble;

45 5) precipitación: mezclado uniforme del filtrado de la etapa 4) con alcohol o cetona en 1-10 veces el volumen del filtrado para precipitar el hialuronato de bajo peso molecular;

6) deshidratación y secado: separar el precipitado de hialuronato de bajo peso molecular de la etapa 5), deshidratación con un disolvente orgánico, a continuación, secado al vacío, para obtener el hialuronato de bajo peso molecular.

50 **[0053]** El procedimiento para la preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención, en el que, en la etapa 1), por cada 1 kg de ácido hialurónico o sales del mismo, se añaden 10^6 - 10^7 UI de hialuronidasa de bacillus.

55 **[0054]** El procedimiento para la preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención, en el que, en la etapa 2), la temperatura para la enzimólisis es de 35°C-45°C, pH para la enzimólisis es de 5,5-7,5, y el ácido hialurónico se enzimoliza hasta un peso molecular de 10 kDa-1000 kDa; preferiblemente de 10 kDa-770kDa o 10 kDa-700kDa o 10 kDa-600kDa o 10 kDa-500 kDa; más preferiblemente 10 kDa-400kDa; más preferiblemente de 10 kDa-300 kDa, 10 kDa-200 kDa, 10 kDa-150 kDa, 10 kDa-100 kDa, 10 kDa-50 kDa o 10 kDa-30 kDa.

60 **[0055]** El procedimiento para la preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso

molecular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención satisface uno o más de los siguientes A-F:

- 5 A. en la etapa 1), el hialuronato se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio y sal de zinc del ácido hialurónico;
- 10 B. en la etapa 2), se utiliza un ácido o una base para ajustar el pH a 4-9, dicho ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, dicha base es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio;
- 15 C. en la etapa 3), la solución de enzimólisis se mantiene a 55°C-65°C durante 20-30 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus;
- 20 D. en la etapa 4), la sal inorgánica soluble se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de zinc y sal de magnesio; preferiblemente, es cloruro, sulfato o nitrato de sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio;
- 25 E. en la etapa 5), dicho alcohol o cetona es etanol, acetona, metanol, propanol, o isopropanol;
- 30 F. en la etapa 6), el disolvente orgánico usado para deshidratar es cetona o alcohol. Con este procedimiento se puede obtener un ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular, que se prepara mediante el procedimiento para la preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención. El ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular pueden tener un disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico en una cantidad de $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ (p/p); específicamente, la cantidad de disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico se mide mediante el procedimiento de HPLC. Más específicamente, las condiciones de HPLC son las siguientes: utilizar una columna de análisis de sacáridos para llevar a cabo una medición de cromatografía líquida de alto rendimiento; fase móvil es una solución de 0,4 mol/l NaH_2PO_4 ; velocidad de flujo es 0,6 ml/min; temperatura de la columna es 35°C; longitud de onda de detección es 232 nm; y tamaño de la muestra es 20 μl . Un procedimiento específico también puede referirse al procedimiento anterior para medir el contenido de ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo (contenido de disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico).

35 **[0056]** El ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular tienen un peso molecular de 10 kDa-1000 kDa; preferiblemente de 10 kDa-770 kDa o 10 kDa-700kDa o 10 kDa-600kDa o 10 kDa-500 kDa; más preferiblemente de 10 kDa-400kDa; más preferiblemente de 10 kDa-300 kDa, 10 kDa-200 kDa, 10 kDa-150 kDa, 10 kDa-100 kDa, 10 kDa-50 kDa o 10 kDa-30 kDa. Específicamente, el ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular se preparan mediante el procedimiento de enzimólisis (procedimiento de digestión con enzimas); mediante el uso de la hialuronidasa de la presente invención.

40 **[0057]** En cuanto al ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular, su contenido tal como se mide mediante el procedimiento de HPLC y su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol tienen una diferencia de menos del 1%.

45 **[0058]** Sin estar limitado por ninguna teoría, cuando se utiliza la misma cantidad de enzima, el ácido hialurónico con un peso molecular diferente puede obtenerse mediante el control del tiempo diferente de enzimólisis, es decir, el ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato oligomérico se pueden obtener mediante el control de un tiempo de enzimólisis adecuado. Sin embargo, en la práctica, la actividad enzimática puede disminuir después de un largo período de tiempo, y la solución de hialuronato pueden estar contaminada con bacterias, por lo que preferiblemente, el ácido hialurónico con un peso molecular diferente se obtiene mediante el control de la adición de diferentes cantidades de enzima, por ejemplo, la preparación de hialuronato de bajo peso molecular necesita menos cantidad de enzima, mientras que la preparación de hialuronato oligomérico necesita más cantidad de enzima.

50 **[0059]** El peso molecular del producto se puede medir mediante el muestreo por intervalos. El peso molecular de hialuronato oligomérico e hialuronato de bajo peso molecular se puede medir mediante el procedimiento GPC-MALLS o procedimiento Laurent (el procedimiento de GPC-MALLS es más conveniente); los expertos en la técnica pueden seleccionar un intervalo de tiempo adecuado para la detección de acuerdo con el conocimiento en la técnica.

55 **[0060]** Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la hialuronidasa de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención, el polinucleótido de la presente invención, el vector recombinante de la presente invención, la célula huésped recombinante de la presente invención; opcionalmente, que comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable o bromatológicamente aceptable.

60 **[0061]** Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un uso del bacillus de la presente invención, el polinucleótido de la presente invención, el vector recombinante de la presente invención, o la célula huésped recombinante de la presente invención en la fabricación de hialuronidasa .

[0062] El uso de los medios técnicos conocidos en el sector, el polinucleótido que codifica la hialuronidasa de acuerdo con

la presente invención se puede clonar a un vector de expresión, se transduce a una célula huésped adecuada, para expresar la hialuronidasa de la presente invención.

5 **[0063]** La presente invención se refiere además a un uso de la hialuronidasa de acuerdo con uno cualquiera de los puntos de la presente invención en la fabricación de ácido oligomérico o hialuronato oligomérico, ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular, o sulfato de condroitina de bajo peso molecular. El ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico o el ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular que se pueden obtener mediante el procedimiento de la invención se pueden usar en la fabricación de un medicamento para promover la angiogénesis y/o promover la cicatrización de heridas, o antioxidación, o el atrapamiento de radicales libres, o protección solar, o la reparación posterior a quemadura solar, o la promoción de la proliferación de células HUVEC, o antitumoral (tal como tumor de mama, cáncer de pulmón o neurospongioma), o mejora de la inmunidad, o en la fabricación de un producto alimenticio o de atención médica o cosmética; específicamente, el cosmético es un protector solar, cosmético de reparación posterior a quemadura solar, antienvjecimiento o hidratante. Estos productos se pueden utilizar en un procedimiento para promover la angiogénesis y/o promover la cicatrización de heridas, o antioxidación, o atrapamiento de radicales libres, o para promover la proliferación de células HUVEC, o inhibir tumores (tales como tumor de mama, cáncer de pulmón, o neurospongioma), in vivo o in vitro, mediante la administración a un sujeto o el uso de una cantidad eficaz del ácido oligomérico o hialuronato oligomérico o el ácido hialurónico de bajo peso molecular o de bajo peso molecular; específicamente, el sujeto es un mamífero, más específicamente, el sujeto es un ser humano. Específicamente, "ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico" pueden también ser llamados brevemente como "ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo", el ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico tienen un peso molecular de menos de 10 kDa; preferiblemente, mayor que o igual a 3000 Da, y menos de 10⁴ Da. El tipo de hialuronato oligomérico no está limitado específicamente, y comprende, pero no se limita a: sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de zinc, y así sucesivamente. Específicamente, "ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular" pueden también ser llamados brevemente como "ácido hialurónico de bajo peso molecular o sales del mismo", ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular tienen un peso molecular de 10 kDa-1.000 kDa; preferiblemente de 10 kDa-500 kDa; más preferiblemente de 10 kDa-400kDa; aún más preferiblemente de 10 kDa-300 kDa, 10 kDa-200 kDa, 10 kDa-150 kDa, 10 kDa-100 kDa, 10 kDa-50 kDa o 10 kDa-30 kDa. El tipo de hialuronato de bajo peso molecular no está limitado específicamente, y comprende, pero no se limita a: sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de zinc, y así sucesivamente.

30 **[0064]** En la presente invención, en relación con el porcentaje de contenido de cierto componente, a menos que se especifique lo contrario, se refiere al porcentaje en peso (p/p).

35 **[0065]** Otros términos de la presente invención se muestran a continuación.

Vector de expresión

40 **[0066]** La presente invención también se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención, un promotor, así como señales de transcripción y de terminación de la traducción. Los diferentes ácidos nucleicos anteriores y secuencias reguladoras se pueden ligar para preparar el vector de expresión recombinante, el vector puede comprender uno o más sitios de restricción convenientes, a fin de insertar o sustituir la secuencia de nucleótidos que codifica la hialuronidasa en estos sitios. O bien, la secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos o una construcción de nucleótidos que contiene la secuencia en un vector de expresión adecuado. Cuando se prepara el vector de expresión, la secuencia de codificación puede estar ubicado en el vector con el fin de estar operativamente unido a una secuencia reguladora de expresión adecuada.

50 **[0067]** El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, plásmido o virus) adecuado para realizar una operación de ADN recombinante y expresar la secuencia de nucleótidos. El vector se selecciona normalmente de acuerdo con la compatibilidad del vector y la célula huésped en la que se introduciría. El vector puede ser el plásmido en bucle lineal o cerrado.

55 **[0068]** El vector puede ser un vector autoreplicante (es decir, la estructura extracromosómico ininterrumpida, que se puede replicar sin cromosoma), tal como un plásmido, elemento extracromosómico, microcromosoma o cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier mecanismo de autorreplicación. O bien, el vector es un vector tal, cuando se introduce en una célula huésped, que se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma al que se integra. Además, un vector o plásmido único o dos o más vectores o plásmidos contienen generalmente ADN completo a introducir en el genoma de la célula huésped, o también se pueden utilizar transposones.

60 **[0069]** Preferiblemente, el vector de la presente invención comprende uno o más marcadores selectivos para la selección de células transformadas. El marcador selectivo es un gen que proporciona al producto una resistencia contra biocida o

virus, una resistencia contra un metal pesado, o proporciona prototrofia auxotrófica. Los ejemplos de marcadores selectivos bacterianos pueden ser el gen *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores de resistencia a antibióticos, tales como ampicilina, kanamicina, clomicetina o tetraciclina.

5 **[0070]** Preferiblemente, el vector de la presente invención comprende elementos que aseguran la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o que garantizan la autoreplicación del vector en células sin depender del genoma de la célula.

10 **[0071]** En cuanto a la autoreplicación, el vector puede comprender el origen de replicación a fin de asegurar la autorreplicación en la célula huésped diana. El origen de replicación puede comprender una mutación que lo cambia en un tipo sensible a la temperatura en la célula huésped (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences 75: 1433).

15 **[0072]** Una o más copias de la secuencia de nucleótidos de la presente invención se pueden insertar en células huésped a fin de aumentar el rendimiento de productos genéticos. El aumento del número de copias del nucleótido puede llevarse a cabo mediante la inserción de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped, o la inserción de un marcador selectivo capaz de amplificación junto con la secuencia de nucleótidos, el cultivo de células en presencia de un agente selectivo adecuado, elección de un gen marcador selectivo que contiene copias amplificadas a fin de obtener células que contienen copias adicionales de la secuencia de nucleótidos.

20 **[0073]** Las operaciones para la unión de los elementos anteriores para construir el vector de expresión recombinante de la presente invención son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, et al, Molecular Cloning Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

25 Célula huésped

30 **[0074]** La presente invención se refiere además a una célula huésped recombinante para la recombinación de la secuencia de nucleótidos (polinucleótido) de la presente invención para la producción de hialuronidasa. El vector que contiene la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser introducido en una célula huésped, de modo que el vector se mantiene en forma del vector extracromosómico integrante del cromosoma o autorreplicante. El término "célula huésped" cubre todas las descendientes diferentes de célula madre debido a mutaciones durante la replicación. La selección de la célula huésped depende principalmente del gen que codifica la hialuronidasa y la fuente del mismo.

35 **[0075]** La célula huésped puede ser célula procariota o célula eucariota, tal como células bacterianas o de levadura. El vector puede introducirse en la célula huésped mediante tecnologías conocidas por los expertos en la técnica.

Procedimiento de preparación

40 **[0076]** La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de recombinación de hialuronidasa de la presente invención, que comprende: (a) cultivar células huésped que contienen una construcción de nucleótidos en condiciones adecuadas para la generación de hialuronidasa, la construcción de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la hialuronidasa; y (b) recuperar el péptido.

45 **[0077]** En el procedimiento de la preparación de la presente invención, las células se cultivan en un medio de cultivo adecuado para la producción de hialuronidasa. Por ejemplo, en un medio de cultivo adecuado, bajo condiciones que permiten la expresión y/o la separación de hialuronidasa, las células se cultivan en matraces de agitación, tanques de laboratorio o de fermentación industrial para la fermentación en pequeña o gran escala (incluyendo, fermentación continua, en lotes, de carga por lotes o en estado sólido). En un medio de cultivo adecuado que contiene fuente de carbono y fuente de nitrógeno, así como sales inorgánicas, se utilizan para el cultivo etapas conocidas en la técnica. El medio de cultivo
50 adecuado puede ser proporcionado por el fabricante o prepararse de acuerdo con una composición conocida (por ejemplo, aquellas en el catálogo de la American Type Culture Collection). Si se secreta hialuronidasa en el medio de cultivo, se puede recuperar directamente del medio de cultivo. Si no se secreta hialuronidasa, se puede recuperar a partir de productos de lisis celular.

55 **[0078]** La hialuronidasa producida se puede recuperar mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede recuperar del medio de cultivo mediante una operación convencional (incluyendo, pero no limitándose a la centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación).

60 **[0079]** La hialuronidasa de la presente invención se pueden purificar mediante etapas conocidas en la técnica, y estas etapas incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión de tamaño), HPLC,

electroforesis (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, editado por JCJanson y Lars Ryden, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

5 Efectos beneficiosos de la invención

[0080] En la presente invención, el procedimiento de utilización de bacillus para producir ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo o ácido hialurónico de bajo peso molecular o sales del mismo es simple en las operaciones, con condiciones moderadas, no hay daño en la estructura de los productos, no hay contaminación del medio ambiente y bajo coste para la hialuronidasa a partir de la fuente de fermentación, y adecuado para la producción industrial a gran escala. El hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular tienen una estructura íntegra, alta pureza, sin citotoxicidad, capacidad antioxidante potente, no amarramiento en color, y se pueden utilizar en el campo de los cosméticos, alimentos y medicamentos.

15 Breve descripción de los dibujos

[0081]

Figura 1: Electroforetograma por SDS-PAGE, en el que, marcador es el Marcador de peso molecular de proteína no teñida; carriles 1, 2, 3 son hialuronidasa preparada en los Ejemplos 10, 11, 12 respectivamente.

Figura 2: espectros infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado mediante diferentes procedimientos, en los que: Figura 2(A) es el espectro de infrarrojos estándar de hialuronato de sodio de acuerdo con la Farmacopea Europea, Figura 2(B) es el espectro de infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado en el Ejemplo comparativo 1, Figura 2(C) es el espectro de infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado en el Ejemplo 13, Figura 2(D) es el espectro de infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado en el Ejemplo 14, Figura 2(E) es el espectro de infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado en el Ejemplo 15, Figura 2(F) es el espectro de infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado en el Ejemplo 16, Figura 2(G) es el espectro de infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado en el Ejemplo 17, Figura 2(H) es el espectro de infrarrojos de hialuronato oligomérico preparado en el Ejemplo 18,

Figura 3: efectos de la temperatura sobre la actividad de la hialuronidasa y resultados experimentales de estabilidad térmica de hialuronidasa. Figura 3(A), efectos de la temperatura sobre la actividad enzimática; Figura 3(B), resultados experimentales de estabilidad térmica de hialuronidasa.

Figura 4: efectos del pH sobre la actividad de la hialuronidasa y resultados experimentales de estabilidad del pH de hialuronidasa. Figura 4(A), efectos del pH sobre la actividad de la enzima; figura 4(B), resultados experimentales de estabilidad del pH de hialuronidasa.

Figura 5(A): gráfico de la tasa de absorción transdérmica de hialuronato oligomérico.

Figura 5(B): gráfico de la capacidad de captación de radicales libres DPPH de hialuronato oligomérico.

Figura 5(C): gráfico de la capacidad de captación de radicales libres DPPH de hialuronato de bajo peso molecular.

Figura 5(D): gráfico de la capacidad de reducción de hialuronato oligomérico.

Figura 5(E): gráfico de la capacidad de reducción de hialuronato de bajo peso molecular.

Figura 6(A): efectos de reparación de hialuronato oligomérico en células L929 después de la radiación UVA.

Figura 6(B): efectos de reparación de hialuronato de bajo peso molecular en células L929 después de la radiación UVA.

Figura 6(C): efectos protectores de hialuronato oligomérico en células L929 contra la radiación UVA.

Figura 6(D): efectos protectores de hialuronato de bajo peso molecular en células L929 contra radiación UVA.

45 [0082] Materiales biológicos depositados relacionados con la presente invención:

[0083] El bacillus (especie bacillus) A50 de la presente invención se depositó el 8 de febrero de 2012 en China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC) con un número de acceso de depósito de CGMCC NO. 5744, y la dirección de depósito es Instituto de Microbiología de la Academia China de Ciencias, 3 #, Buld. 1, West Beichen Road, distrito de Chaoyang, Beijing, 100101.

Modelos específicos para llevar a cabo la invención

[0084] Algunas realizaciones de la presente invención se ilustran en detalle en conjunción con los siguientes ejemplos, pero los expertos en la técnica entenderán que los siguientes ejemplos pretenden simplemente ilustrar la invención, pero no deben considerarse como limitación del alcance de la presente invención. Las técnicas o condiciones específicas que no se indican en los ejemplos se llevaron a cabo de acuerdo con las técnicas o condiciones descritas en los documentos en la técnica (por ejemplo, J. Sambrook, et al., traducido por HUANG Peitang, et al, "Molecular Cloning ", 3ª edición, Science Press) o de acuerdo con las especificaciones de los productos. Esos reactivos o instrumentos de los que no se proporcionaron los fabricantes fueron todos los productos convencionales disponibles comercialmente.

5 **[0085]** En los siguientes Ejemplos o Ejemplos comparativos, el peso molecular de hialuronato oligomérico y de hialuronato de bajo peso molecular se midió mediante el procedimiento GPC-MALLS; el contenido se midió mediante el procedimiento de HPLC o procedimiento del carbazol. El ácido hialurónico oligomérico o ácido hialurónico de bajo peso molecular y el ácido hialurónico tal como se prepara por fermentación directa (la estructura no se rompió) consistían todos en unidades repetitivas de disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico, de modo que su contenido era igual a su contenido de disacáridos, el ácido hialurónico oligomérico o ácido hialurónico de bajo peso molecular o ácido hialurónico normal podría degradarse en disacáridos con hialuronidasa de bacillus, el contenido de disacáridos se podría determinar mediante procedimiento de HPLC con el fin de obtener el contenido de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular. El contenido de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular también se puede determinar por el procedimiento de carbazol (LING Peixue, ácido hialurónico [M] Beijing: China Light Industry Press, 2002). Si la estructura de ácido hialurónico o sales del mismo estuviera rota, la hialuronidasa no rompería el enlace glucosídico de las partes rotas, de modo que esto daría lugar a la disminución del contenido de disacárido. El mecanismo del procedimiento de carbazol comprende determinar el contenido de ácido hexurónico, a continuación, el contenido de ácido hialurónico oligomérico o ácido hialurónico de bajo peso molecular o ácido hialurónico obtenido por fermentación directa se podría derivar del mismo. Por lo tanto, la diferencia del contenido medida por estos dos procedimientos podría ser utilizada para observar indirectamente si la estructura de ácido hialurónico o sales del mismo se rompía, así como el grado de rotura de la misma.

20 **[0086]** La hialuronidasa (es decir, hialuronidasa de bacillus, de aquí en adelante) que se utiliza para la degradación de ácido hialurónico o sales del mismo en la presente invención se obtuvo mediante: preparación de un caldo de fermentación de hialuronidasa obtenido por la fermentación del bacillus A50, siguiendo etapas, tales como centrifugación, precipitación fraccional con sulfato de amonio, ultrafiltración, y así sucesivamente. El procedimiento de preparación comprendía: tomar una cepa en pendiente (especie bacillus A50 CGMCC NO 5744) e inocular en medio de cultivo de siembra esterilizado, cultivado a 25°C-40°C, 100-200 rpm durante 10-24 horas, a continuación, inocular la solución de siembra en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación de 3%-15%, cultivar a 25°C-40°C, 100-300 rpm durante 12-24 horas, manteniendo el pH a 6,0-8,0 durante el procedimiento de fermentación utilizando un ácido, para obtener caldo de fermentación de hialuronidasa después del final de la fermentación; centrifugar el caldo de fermentación bajo 10000-15000 rpm durante 10-20 minutos para obtener el sobrenadante, añadir al sobrenadante con sulfato de amonio para alcanzar una concentración de 20% p/v-25% p/v, extraer el precipitado generado por filtración, a continuación, añadir continuamente sulfato de amonio, hasta que la concentración es de 35% p/v-40% p/v, disolver el precipitado obtenido, es decir hialuronidasa, en solución tampón de fosfato, y finalmente eliminar las impurezas moleculares pequeños con una membrana de filtración de 3×10^4 Da para obtener hialuronidasa útil en enzimólisis.

35 **[0087]** Los medios de cultivo utilizados fueron:
 medio de cultivo en pendiente (100 ml): 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5-1,5 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; pH se ajusta a 6,0-8,0, agua, temperatura de cultivo en pendiente es 25°C-40°C.
 medio de cultivo de siembra (100 ml): 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5-1,5 g de glucosa; pH se ajusta a 6,0-8,0.
 40 medio de cultivo de fermentación (100 ml): 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5-1,5 g de glucosa, 0,05 ml de Tween 80; pH se ajusta a 6,0-8,0.

45 **[0088]** El caldo de fermentación preparado por el procedimiento anterior se midió por el procedimiento de farmacopea china (véase: farmacopea china, edición de 2010, Apéndice VII C. Medición de la hialuronidasa) y la actividad de hialuronidasa del mismo era de 1×10^5 - 3×10^5 UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada era 8×10^6 - $1,5 \times 10^7$ UI/mg.

Ejemplo 1: Adquisición e identificación de bacillus (especie bacillus) A50

50 1. Adquisición de bacillus (especie bacillus) A50

55 **[0089]** Abrir la placa de cubierta de una placa de Petri que contiene un medio de cultivo de enriquecimiento, colocar la cápsula en el aire para recoger las bacterias sedimentadas del aire, la placa de cubierta se cerró después de 1 h, la placa se colocó entonces en una incubadora a 25°C-40°C para cultivo aerobio, después de 24 horas de cultivo, la única colonia obtenida por separación se inoculó en medio de cultivo de cribado, se realizó un cultivo aerobio a 25°C-40°C, 150 rpm, durante 12-16 horas, la actividad de la hialuronidasa de los mismos se midió mediante el procedimiento de farmacopea china, se eligió la cepa con la actividad enzimática más alta como la cepa de la presente invención, y la actividad enzimática de la cepa podría ser de hasta 10^5 UI/ml.

60 **[0090]** Las composiciones de los medios de cultivo anteriores utilizados fueron los siguientes:

[0091] Medio de cultivo de enriquecimiento (100 ml): 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01-1 g de hialuronato de sodio, 2,0 g de polvo de agar.

5 [0092] Medio de cultivo de cribado (100 ml): 0,2-2,0 g de peptona, 0,2-2,0 g de polvo de levadura, 0,05-0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05-0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01-1 g de hialuronato de sodio.

10 [0093] El bacillus (especie bacillus) A50 obtenido fue depositado el 8 de febrero de 2012 en China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC) con un número de acceso de depósito de CGMCC NO. 5744, y la dirección de depósito fue Instituto de Microbiología de la Academia China de Ciencias, 3 #, Buld. 1, West Beichen Road, distrito de Chaoyang, Beijing, 100101.

2. Características morfológicas de bacillus (especie bacillus) A50

15 [0094] El bacillus tenía forma de varilla, en forma simple o cadena. La colonia bacteriana era blanca leche y tenía arrugas.

3. Identificación de características biológicas moleculares de bacillus (especie bacillus) A50

20 [0095] Cebador universal de 16S rDNA bacteriano se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de Weisburg:
Cebador 1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; (SEQ ID NO: 4);
Cebador 2: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3' (SEQ ID NO: 5).

[0096] El ADN total de la cepa A50 (extraída por medio de kit DNAout bacteriano de tipo columna de Beijing Tiandz, Inc.) se utilizó como plantilla, su fragmento 16S rDNA se amplificó y el sistema de reacción de amplificación de PCR fue el siguiente:

25	solución tampón 10xPCR	5,0 μ l
	dNTP (10 mM)	1,0 μ l
	cebador 1 (10 μ M)	1,0 μ l
	cebador 2 (10 μ M)	1,0 μ l
	Taq ADN polimerasa (5U/ μ l)	0,5 μ l
30	plantilla de ADN (50 ng/ μ l)	0,5 μ l
	adición con agua desionizada hasta un volumen total	50 μ l

[0097] Las condiciones de reacción PCR fueron las siguientes:

35	95 °C	5 min	} 30 ciclos
	94 °C	30 s	
	56 °C	1 min	
40	72 °C	6 min	
45	72 °C	10 min	
	4 °C	terminación de la reacción	

50 [0098] El producto de PCR se detectó con electroforesis en gel de agarosa y se secuenció (Weisburg WG, Bams SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J] Journal of Bacteriology, 1991, 173 (2): 697 - 703). La secuencia del 16S rDNA (SEQ ID NO: 1, 1418bp) obtenida fue el siguiente:

55

60

5 gcggtggct ccttacgggt accccaccga ctccgggtgt tacaaactct cgtgggtgta cgggcbgggt
 gtacaaggcc cgggaacgta ttcaccgcgg catgctgac cgcgattact agcgattccg gcttcatgca
 10 ggcgagttgc agcctgcaat ccgaactgag aatgggttta tgggattggc taaacctcgc ggtcttgca
 ccctttgtac catccattgt agcacgtgtg tagcccagggt cataaggggc atgatgattt gacgcatcc
 ccaccttct ccggtttgt accggcagtc acctagagt gcccaactga atgctggcaa ctaagatcaa
 15 gggttgcgct cgttgcggga ctaacccaa catctcacga cagagctga cgacaacat gcaccacctg
 tcaactctgc cccgaagg gaacgtccta tcttaggag tgcagagga tgtcaagacc tgtaagggt
 ctccgcttg cttcgaatta aaccacatgc tccaccgct gtgcgggccc cgtcaattc ctttgagtt
 cagccttgcg gccgtactcc ccaggcggag tgctaatgc gttagctgca gcactaaagg gcggaaacc
 20 tctaacactt agcactcatc gtttacggcg tggactacca gggtatctaa tctgtttgc tccccagct
 ttcgcgcctc agcgtcagtt acagaccaga aagccgcctt cgccactggt gttcctccac atctctacgc
 attcaccgc tacacgtgga attccgctt cctctctgt actcaagtcc cccagttcc aatgacctc
 25 caggttgag ccgtgggct tcatcaga cttaaaggac cgctgcgcg cgtttacgc ccaataattc
 cggacaacgc tggccaccta cgtattaccg cggctgctgg cacgtagtta gccgtggctt tctggttagg
 30 taccgtcaag gtaccggcag ttactccggt actgttctt ccctaacaac agagctttac gaccggaagg
 cttcatcgc tcacggcg tgctccgc agacttctt ccattgcgga agattcccta ctgtgcctc
 ccgtaggagt ctgggcccgt tctcagtccc agtgggccc atcacctct caggtcggct acgcatcgtc
 35 gccttgggta gccgttacct caccaactag ctaatgcgcc gcgggccc atgtaagtgt cagcgtaaac
 cgacttcag ctttctca tgagaggaaa aggattatcc ggtattagct ccggttccc gaagttatcc
 40 cagtcttaca ggcaggtgc ccacgtgta ctcaccgctc cgccgtaac caagaggtgc aagcacctca
 agattcgtc gacttgca (SEQ ID NO: 1).

45 Ejemplo 2: Análisis de clones y secuencias de hialuronidasa

[0099] El ADN genómico del bacillus (especie bacillus) A50 se extrajo mediante el kit Bacteria Genomic DNA Extraction, el resultado de la extracción de ADN genómico se detectó con electroforesis en gel de agarosa al 1%. El genoma se secuenció para obtener toda la secuencia (shotgun) del genoma de la cepa. Mientras tanto, la hialuronidasa aislada y purificada a partir del caldo de fermentación de bacillus (bacillus) A50 se sometió a secuenciación N-terminal y secuenciación de segmento de péptido interno después de la degradación con tripsina, a fin de obtener la secuencia parcial de aminoácidos de la hialuronidasa. Toda la secuencia (shotgun) del genoma y la secuencia parcial de aminoácidos se alinearon utilizando herramientas BLAST de NCBI, a fin de averiguar el segmento del gen con 100% de similitud con la secuencia de aminoácidos, y por lo tanto encontrar la posición aproximada del gen que codifica la hialuronidasa. Posteriormente, basándose en la secuencia N-terminal de la hialuronidasa, el tamaño de bandas electroforéticas SDS-PAGE, y el análisis del marco de lectura abierto (ORF) con software GeneTool, se determinaron la posición específica y la secuencia de nucleótidos íntegra de gen diana se determinaron, y la secuencia de nucleótidos se tradujo en la secuencia de aminoácidos mediante el uso de software BioEdit.

60 [0100] La secuencia de aminoácidos de la hialuronidasa (SEQ ID NO: 2, 1106 aminoácidos) fue la siguiente:

5 NESTLLLNTSFEETEAPKSGWDQLGAPKWGVWRPTGSPIVTITKEASRTGEYGL
 KIAAAQSARAAVSQDVPVQGGQTYQLGTWLKTDNIVSGQGARLRVVLVEGTQQLGL
 LYSSRLTGTHDWSQIKMEVKTPANADSIRVQLFFETGTGTALFDDVSLQLIQPATSI
 10 EASEITIKEQETGLLHAQMVPADASSKVSWSADPSIATVDNGKVTGVNPGGTTIMAF
 TDNGLAATSTVKVIKNDGIERPEVTQLDLQPKELELGSGQVRLQAIIPATADA
 WSSSNEAVASIQKGLIEAKASGTAVITVETEDGSLKSESQITVTDVAVDEYDQLRKKW
 15 KSLMTGLDSYDPTNVRMNEMIQNQTKSAETLWKTMTFKNNDRSFLWINFASTDNSADI
 RDSYRNLTMAKAFANEHSSLYRNPQLLDITEALEWLYQNRYNESIAQYSNWWHW
 EIGVPNELNSLMVLLYDYLDQDSIHRYLKVVDFHQPDPKSGATTPEKYREALGANRI
 20 DVSKVVGVRGVIVKDATKIAAARDALSQTFENVTEGDGFYEDGSFVQHENIAYNGSY
 GIVLIEGLTDMLELLSNSTWQVTDPKVTNVYDWIETAYEPFMYK GALMDMVRGRAIS
 25 RNFLQDHDQAGHTIIKSVIRMAQFAPEPYAEKYNSMAKYWLQEDTYLDYFKNAGNFRD
 ITLAKQLLEKQEVTPRGDLDFHKTFFASMDRVVHRKSGYAFGISMYSNRIQNYEDMND
 ENRKGWYTGEGMTYLYNGDLAQYSDDFWPTVDPYRMPGTTVDTMRRADGSGEHR
 30 SSESWTGGSTLKNFGSAGMSYDAWNSSLIAKKSWFMFDNEIVALGAGITSSSEDRNV
 ESIVENRKIRNDGSNQLVINGETLNLSNGGQNQTMAAKWAFLEGNVPGADIGYYFPE
 35 GKMLTIKKEERTGAWKDINYGGPAEAIKRSYTTMWFHDHGVVRPEQDTYSYVLLPGLNK
 EQTHQYSQNPDITILRNDQAVQAVQDVKENIIGANFWKDEKQSAGPLTVYQKASVTM
 QEKDGVLEIAVCDPTMENKGSIEIEIDGKAFKVLEADESITVENTKPSIKLKVNVNEAK
 40 GKTFTAKLMIPSQKGNPNSIR (SEQ ID NO: 2)

[0101] La secuencia de nucleótidos del gen que codifica hialuronidasa (SEQ ID NO: 3, 3324 pb, que codifica 1106 aminoácidos) fue la siguiente:

45 AATGAATCTACTTTACTATTGAATACTAGTTTTGAAGAGACGGAGGCGCCAAA
 ATCAGGCTGGGATCAATTAGGTGCACCAAATGGGGTGTCTGGAGACCTACCGG
 50 AAGCCCCATTGTAACCATTACAAAGGAAGCAAGCCGTACGGGTGAGTATGGTTTA

55

60

ES 2 665 556 T3

AAAATTGCCGCGGGCGCAATCTGCTAGAGCTGCCGTGTCACAGGATGTACCTGTT
5 CAGGGCGGGCAGACCTATCAGTTAGGCACCTGGCTGAAGACAGATAATATCGTC
AGCGGTCAAGGGGCGCGGCTGAGGGTTGTTTTATATGAAGGAACCCAGCAGCTG
GGCTTACTTTACTCTTCAAGATTAAGTGGGACCCACGATTGGTCGCAAATAAAAAT
10 GGAGGTAAAGACTCCTGCCAATGCCGATAGCATCCGTGTCCAGCTTTTCTTTGAA
ACAGGAACGGGTACAGCCCTATTTGATGATGTTTCACTGCAGCTCATCCAGCCAG
CTACGTGATTGCTATCGAAGAAAGTGAAATCACCATCAAAGAGCAGGAAACAGG
15 TTTATTGCATGCACAGATGGTTCCTGCTGATGCCAGCTCCAAAGTATCTTGGGTG
TCGGCGGATCCATCGATTGCCACCGTTGATAACGGTAAGGTTACGGGTGTAAATC
CCGGGGGACAACGATTATGGCTTTTACCGATAACGGGCTTGCTGCCACTAGTA
20 CCGTAAAAGTGATCAAAAATGATGGTATTGAACGGCCGGAGGTAACACAGTTGGA
TCTACAACCAAAGGAACTCGAGCTTGGATCAGGTCAAGTGCGATTGCTTCAGGCA
ATTATCGCACCAGCCACTGCCGATGCAGAAAAGTTGGTATGGAGCTCTTCCAATG
25 AAGCAGTCGCTTCTATTCAAAAAGGACTTATTGAAGCGAAAGCCTCAGGAACTGC
TGTGATTACCGTAGAAACGGAAGATGGCAGCTTAAAGAGTGAAAGCCAGATTACC
GTTACCGATGCAGTCGTAGATGAATATGATCAACTTCGGAAAAAGTGAAAAAGCC
30 TGATGACTGGTCTTGATTTCGTACGACCCGACGAATGTGCGGATGAACGAAATGAT
TCAGAACCAGACAAAATCAGCGGAAACCCCTTTGGAAAACAATGTTTAAAAATAACG
ATCGTTTCGTTCTTATGGATTAACCTTTGCAAGCACTGACAATTCGGCTGATATTCGC
35 GACAGCTACCGGAATCTAACGACCATGGCTAAAGCGTTTGCCAATGAACACTCCA
GCCTTTATCGAAATCCGCAATTGCTAAAGGATATCACGGAGGCGCTAGAGTGGCT
GTACCAAAAATCGCTATAACGAAAGTATTGCTCAATATAGCAATTGGTGGCATTGG
40 GAAATCGGTGTCCCGAATGAATTAACAGTTTAAATGGTTCTTCTATATGATTATTT
GGATCAAGATAGTATTCATCGCTACTTGAAAGTAGTCGACCACTTTCAACCAGATC
CAACGAAATCCGGAGCCACCACTCCCGAGAAATACCGGGAAGCTCTTGGCGCCA
45 ATCGGATTGATGTCAGCAAGGTAGTCGGTGTGCGAGGGTAATTGTGAAGGACG
CCACGAAAATTGCGGCTGCACGAGATGCCCTAAGCCAACTTTTGAAAACGTAAC
TGAAGGAGACGGTTTTTATGAAGATGGCTCCTTCGTTTCAGCATGAGAATATCGCC
50 TATAACGGGTCATACGGCATTGTCTTAATTGAAGGCTTGACTGACATGCTCGAAC
TCTTAAGTAATTCTACTTGGCAAGTACTGACCCTAAGGTTACCAATGTTTATGAC
TGGATTGAACTGCCTATGAACCATTTATGTATAAAGGTGCTTTGATGGATATGGT
55 GAGAGGAAGAGCGATTTACGTAATTTCTTCAGGATCATCAGGCTGGACACACC
ATTATCAAAGTGTGATTGCAATGGCACAATTTGCTCCAGAGCCATATGCAGAGA
AGTATAATTCCATGGCAAATACTGGCTTCAAGAAGATACTTACCTGGATTATTTT
60 AAAACGCGGGTAACCTCCGCGATATCACTCTTGCAAAGCAGCTTTTGGAAAAAC
AAGAGGTCACCCCTCGCGGAGATCTTGATTTTTCATAAGACTTTTCGCCTCCATGGA

5 CCGGGTTGTCCACAGAAAATCGGGCTATGCGTTTGGTATCAGTATGTATTCAAAC
 AGGATTCAAATTATGAAGACATGAATGATGAAAACCGCAAAGGCTGGTATACCG
 GAGAAGGGATGACCTACTTATATAATGGTGACCTCGCTCAATATAGTGATGATTTT
 10 TGGCCGACAGTGGACCCGTACCGGATGCCAGGGACAACGGTTGATACGATGAGA
 CGAGCGGATGGAAGTGGTGAGCACAGGTCGTCAGAGTCATGGACTGGCGGTTCA
 ACCCTAAAGAATTTTGGTTCTGCAGGAATGTCTTATGATGCTTGAATAGTTCATT
 15 GATTGCCAAAAGTCATGGTTTATGTTTCGATAACGAAATCGTTGCCCTTGGTGCA
 GGGATTACTAGCAGTGAAGACCGGAATGTTGAGAGTATTGTCGAAAACCGAAAGA
 20 TTCGAAATGACGGTTCCAATCAATTGGTCATCAATGGTGAAACGCTGAATTTAAGC
 AATGGTGGTCAAACCAAACGATGGCCGCTAAATGGGCTTTTCTTGAAGGGAATG
 TCCCAGGAGCAGATATTGGTTACTATTTCCCAGAAGGTAATAATGCTGACGATTA
 25 AAAGAAGAACGTACCGGTGCATGGAAAGATATTAATTATGGCGGTCCAGCTGAAG
 CGATCAAGCGATCCTACACAACGATGTGGTTTGACCATGGTGTCCGTCTGAGCA
 GGATACGTACTCCTATGTTCTATTGCCAGGTTTAAATAAGGAACAAACACACCAAT
 30 ATTCTCAAATCCTGATATTACGATTTTACGAAATGATTCTGCTGTCCAAGCGGTA
 CAAGACGTAAAGGAGAATATCATAGGGGCTAATTTCTGGAAGGATGAAAAGCAA
 35 GTGCTGGTCCGTTAACTGTTTATCAAAAAGCCTCCGTGACCATGCAGGAGAAGGA
 TGGAGTCCTTGAGATTGCTGTATGTGATCCGACGATGGAAAACAAGGGTTCTATC
 GAAATCGAAATTGATGGCAAGGCGTTCAAGGTTTTAGAAGCCGATGAAAGTATCA
 40 CGGTAGAAAATACGAAGCCGTCAATCAAGTTGAAGGTCAATGTGAATGAGGCAAA
 AGGGAAAACGTTTACAGCGAAATTGAAAATGATTCCGAGCCAAAAGGGCAATAGC
 45 CCGAACTCAATCAGATAATAA (SEQ ID NO: 3)

50 **[0102]** El análisis de la homología de secuencia de aminoácidos basado en software NCBI/BLAST mostró: la proteína que tenía la más alta similitud con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 fue un precursor XalB de xantano liasa de un bacillus (*Paenibacillus alginolyticus*), la similitud fue hasta el 46%, las proteínas con similitud de 31%-46% fueron mayormente hialuronato liasas, así como xantano liasas, familia de polisacárido liasa-8 y algunas otras proteínas supuestas o no identificadas, que pertenecían todas a la familia de mucopolisacárido (GAG) liasa.

55 **[0103]** El análisis de homología de secuencia de genes basado en software NCBI/BLAST mostró: no hubo ninguna secuencia homóloga a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, lo que indicó que el gen que codificaba la hialuronidasa con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 era un nuevo gen.

Ejemplo 3: Preparación de hialuronidasa (1)

60 **[0104]** Composición del medio de cultivo en pendiente (100 ml): 0,2 g de peptona, 2,0 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; se utiliza ácido clorhídrico para ajustar

el pH a 6,0.

[0105] Composición del medio cultivo de siembra (100 ml): 0,2 g de peptona, 2,0 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa; se utiliza ácido clorhídrico para ajustar el pH a 6,0.

[0106] Composición del medio de cultivo de fermentación (100 ml): 0,2 g de peptona, 2,0 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa, 0,05 ml de Tween-80.

[0107] La cepa en pendiente (especie bacillus A50, CGMCC NO. 5744) se inoculó en un medio de cultivo de siembra esterilizado, se cultivó a 25°C, 150 rpm durante 24 horas, a continuación, la solución de siembra se inoculó en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación del 10%, se cultivó a 25°C, 200 rpm durante 24 horas, se utilizó ácido sulfúrico durante el procedimiento de fermentación para mantener el pH en 6,0, el caldo de fermentación de hialuronidasa se obtuvo mediante fermentación, el caldo de fermentación se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante, el sobrenadante se añadió con sulfato amónico para alcanzar una concentración de 20%, el precipitado se extrajo por filtración, a continuación, se añadió continuamente sulfato de amonio hasta que la concentración del mismo alcanzó el 35%, el precipitado obtenido se tomó como hialuronidasa, se disolvió el precipitado de hialuronidasa obtenido en solución tampón de fosfato (pH 6,0, 50 mmol/l), y finalmente, las impurezas moleculares pequeñas se eliminaron con una membrana de ultrafiltración de 3×10^4 Da para obtener la hialuronidasa purificada.

[0108] La actividad de la hialuronidasa en el caldo de fermentación fue de $1,0 \times 10^5$ UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada fue de $8,0 \times 10^6$ UI/mg, medidas utilizando el procedimiento en la farmacopea china.

Ejemplo 4: Preparación de hialuronidasa (2)

[0109] Composición del medio de cultivo en pendiente (100 ml): 1,0 g de peptona, 1,0 g de polvo de levadura, 0,1 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; se utiliza ácido fosfórico para ajustar el pH a 7,0.

[0110] Composición del medio cultivo de siembra (100 ml): 1,0 g de peptona, 1,0 g de polvo de levadura, 0,1 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de glucosa; se utiliza ácido fosfórico para ajustar el pH a 7,0.

[0111] Composición del medio de cultivo de fermentación (100 ml): 1,0 g de peptona, 1,0 g de polvo de levadura, 0,1 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de glucosa, 0,05 ml de Tween-80.

[0112] Se tomó la cepa en pendiente (especie bacillus A50, CGMCC NO. 5744) y se inoculó en un medio de cultivo de siembra esterilizado, se cultivó a 30°C, 100 rpm durante 15 horas, a continuación, la solución de siembra se inoculó en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación del 10%, se cultivó a 35°C, 300 rpm durante 16 horas, se utilizó ácido sulfúrico durante el procedimiento de fermentación para mantener el pH en 7,0, el caldo de fermentación de hialuronidasa se produjo y obtuvo mediante fermentación, el caldo de fermentación se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante, el sobrenadante se añadió con sulfato amónico para alcanzar una concentración de 22%, el precipitado se extrajo por filtración, a continuación, se añadió continuamente sulfato de amonio hasta que la concentración del mismo alcanzó el 38%, el precipitado de hialuronidasa obtenido se disolvió en solución tampón de fosfato (pH 6,0, 50 mmol/l), y finalmente, las impurezas moleculares pequeñas se eliminaron con una membrana de ultrafiltración de 3×10^4 Da para obtener la hialuronidasa purificada.

[0113] La actividad de la hialuronidasa en el caldo de fermentación fue de $3,0 \times 10^5$ UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada fue de $9,5 \times 10^6$ UI/mg, medidas utilizando el procedimiento en la farmacopea china.

Ejemplo 5: Preparación de hialuronidasa (3)

[0114] Composición del medio de cultivo en pendiente (100 ml): 1,5 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; se utiliza ácido sulfúrico para ajustar el pH a 8,0.

[0115] Composición del medio cultivo de siembra (100 ml): 1,5 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de glucosa; se utiliza ácido sulfúrico para ajustar el pH a 8,0.

[0116] Composición del medio de cultivo de fermentación (100 ml): 0,5 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,1 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de glucosa, 0,05 ml de Tween-80.

5 **[0117]** Se tomó la cepa en pendiente (especie bacillus A50, CGMCC NO. 5744) y se inoculó en un medio de cultivo de siembra esterilizado, se cultivó a 35°C, 200 rpm durante 13 horas, a continuación, la solución de siembra se inoculó en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación del 10%, se cultivó a 40°C, 100 rpm durante 12 horas, se utilizó ácido clorhídrico durante el procedimiento de fermentación para mantener el pH en 7,0, el caldo de fermentación de hialuronidasa se obtuvo mediante fermentación, el caldo de fermentación se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos para obtener el sobrenadante, el sobrenadante se añadió con sulfato amónico para alcanzar una concentración de 15%, el precipitado generado se extrajo por filtración, a continuación, se añadió continuamente sulfato de amonio hasta que la concentración del mismo alcanzó el 35%, se tomó el precipitado de hialuronidasa obtenido y se disolvió en solución tampón de fosfato (pH 6,0, 50 mmol/l), y finalmente, las impurezas moleculares pequeñas se eliminaron con una membrana de ultrafiltración de 3×10^4 Da para obtener la hialuronidasa purificada.

10 **[0118]** La actividad de la hialuronidasa en el caldo de fermentación fue de $1,2 \times 10^5$ UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada fue de $9,0 \times 10^6$ UI/mg, medidas utilizando el procedimiento en la farmacopea china.

15 Ejemplo 6: Preparación de hialuronidasa (4)

20 **[0119]** Composición del medio de cultivo en pendiente (100 ml): 2,0 g de peptona, 0,5 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; se utiliza ácido sulfúrico para ajustar el pH a 6,5.

20 **[0120]** Composición del medio cultivo de siembra (100 ml): 2,0 g de peptona, 0,5 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de glucosa; se utiliza ácido sulfúrico para ajustar el pH a 6,5.

25 **[0121]** Composición del medio de cultivo de fermentación (100 ml): 1,5 g de peptona, 0,2 g de polvo de levadura, 0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de glucosa, 0,05 ml de Tween-80.

30 **[0122]** Se tomó la cepa en pendiente (especie bacillus A50, CGMCC NO. 5744) y se inoculó en un medio de cultivo de siembra esterilizado, se cultivó a 40°C, 180 rpm durante 10 horas, a continuación, la solución de siembra se inoculó en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación del 10%, se cultivó a 36°C, 280 rpm durante 15 horas, se utilizó ácido fosfórico durante el procedimiento de fermentación para mantener el pH en 8,0, el caldo de fermentación de hialuronidasa se obtuvo mediante fermentación, el caldo de fermentación se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante, el sobrenadante se añadió con sulfato amónico para alcanzar una concentración de 20%, el precipitado generado se extrajo por filtración, a continuación, se añadió continuamente sulfato de amonio hasta que la concentración del mismo alcanzó el 40%, se tomó la hialuronidasa obtenida y se disolvió en solución tampón de fosfato (pH 6,0, 50 mmol/l), y finalmente, las impurezas moleculares pequeñas se eliminaron con una membrana de ultrafiltración de 3×10^4 Da para obtener la hialuronidasa purificada.

35 **[0123]** La actividad de la hialuronidasa en el caldo de fermentación fue de $1,5 \times 10^5$ UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada fue de $8,2 \times 10^6$ UI/mg, medidas utilizando el procedimiento en la farmacopea china.

40 Ejemplo 7: Preparación de hialuronidasa (5)

45 **[0124]** Composición del medio de cultivo en pendiente (100 ml): 0,5 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; se utiliza ácido fosfórico para ajustar el pH a 7,5.

45 **[0125]** Composición del medio cultivo de siembra (100 ml): 0,5 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa; se utiliza ácido fosfórico para ajustar el pH a 7,5.

50 **[0126]** Composición del medio de cultivo de fermentación (100 ml): 2,0 g de peptona, 0,2 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa, 0,05 ml de Tween-80.

55 **[0127]** Se tomó la cepa en pendiente (especie bacillus A50, CGMCC NO. 5744) y se inoculó en un medio de cultivo de siembra esterilizado, se cultivó a 36°C, 120 rpm durante 14 horas, a continuación, la solución de siembra se inoculó en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación del 10%, se cultivó a 30°C, 180 rpm durante 20 horas, se utilizó ácido fosfórico durante el procedimiento de fermentación para mantener el pH en 7,5, el caldo de fermentación de hialuronidasa se obtuvo mediante fermentación, el caldo de fermentación se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante, el sobrenadante se añadió con sulfato amónico para alcanzar una concentración de 25%, el precipitado generado se extrajo por filtración, a continuación, se añadió continuamente sulfato de amonio hasta que la concentración del mismo alcanzó el 40%, se tomó el precipitado de hialuronidasa obtenido y se disolvió en solución tampón de fosfato (pH 6,0, 50 mmol/l), y finalmente, las impurezas moleculares pequeñas se eliminaron

con una membrana de ultrafiltración de 3×10^4 Da para obtener la hialuronidasa purificada.

[0128] La actividad de la hialuronidasa en el caldo de fermentación fue de $2,0 \times 10^5$ UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada fue de $9,3 \times 10^6$ UI/mg, medidas utilizando el procedimiento en la farmacopea china.

5

Ejemplo 8: Preparación de hialuronidasa (6)

[0129] Composición del medio de cultivo en pendiente (100 ml): 1,0 g de peptona, 1,0 g de polvo de levadura, 0,1 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; se utiliza ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,0.

10

[0130] Composición del medio cultivo de siembra (100 ml): 1,0 g de peptona, 1,0 g de polvo de levadura, 0,1 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de glucosa; se utiliza ácido clorhídrico para ajustar el pH a 7,0.

15

[0131] Composición del medio de cultivo de fermentación (100 ml): 1,5 g de peptona, 0,5 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g de glucosa, 0,05 ml de Tween-80.

[0132] Se tomó la cepa en pendiente (especie bacillus A50, CGMCC NO. 5744) y se inoculó en un medio de cultivo de siembra esterilizado, se cultivó a $32^\circ C$, 150 rpm durante 18 horas, a continuación, la solución de siembra se inoculó en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación del 10%, se cultivó a $28^\circ C$, 200 rpm durante 22 horas, se utilizó ácido clorhídrico durante el procedimiento de fermentación para mantener el pH en 8,0, el caldo de fermentación de hialuronidasa se obtuvo mediante fermentación, el caldo de fermentación se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante, el sobrenadante se añadió con sulfato amónico para alcanzar una concentración de 24%, el precipitado generado se extrajo por filtración, a continuación, se añadió continuamente sulfato de amonio hasta que la concentración del mismo alcanzó el 36%, se tomó el precipitado de hialuronidasa obtenido y se disolvió en solución tampón de fosfato (pH 6,0, 50 mmol/l), y finalmente, las impurezas moleculares pequeñas se eliminaron con una membrana de ultrafiltración de 3×10^4 Da para obtener la hialuronidasa purificada.

20

25

[0133] La actividad de la hialuronidasa en el caldo de fermentación fue de $1,8 \times 10^5$ UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada fue de $8,4 \times 10^6$ UI/mg, medidas utilizando el procedimiento en la farmacopea china.

30

Ejemplo 9: Preparación de hialuronidasa (7)

[0134] Composición del medio de cultivo en pendiente (100 ml): 2,0 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa, 2,0 g de polvo de agar; se utiliza ácido fosfórico para ajustar el pH a 7,0.

35

[0135] Composición del medio cultivo de siembra (100 ml): 2,0 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,05 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g de glucosa; se utiliza ácido fosfórico para ajustar el pH a 7,0.

40

[0136] Composición del medio de cultivo de fermentación (100 ml): 0,5 g de peptona, 1,5 g de polvo de levadura, 0,15 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de glucosa, 0,05 ml de Tween-80.

[0137] Se tomó la cepa en pendiente (especie bacillus A50, CGMCC NO. 5744) y se inoculó en un medio de cultivo de siembra esterilizado, se cultivó a $30^\circ C$, 200 rpm durante 20 horas, a continuación, la solución de siembra se inoculó en medio de cultivo de fermentación esterilizado, siendo la cantidad de inoculación del 10%, se cultivó a $34^\circ C$, 220 rpm durante 14 horas, se utilizó ácido fosfórico durante el procedimiento de fermentación para mantener el pH en 7,5, el caldo de fermentación de hialuronidasa se obtuvo mediante fermentación, el caldo de fermentación se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos para obtener el sobrenadante, el sobrenadante se añadió con sulfato amónico para alcanzar una concentración de 25%, el precipitado generado se extrajo por filtración, a continuación, se añadió continuamente sulfato de amonio hasta que la concentración del mismo alcanzó el 38%, se tomó el precipitado de hialuronidasa obtenido y se disolvió en solución tampón de fosfato (pH 6,0, 50 mmol/l), y finalmente, las impurezas moleculares pequeñas se eliminaron con una membrana de ultrafiltración de 3×10^4 Da para obtener la hialuronidasa purificada.

45

50

[0138] La actividad de la hialuronidasa en el caldo de fermentación fue de $1,2 \times 10^5$ UI/ml, y la actividad específica de la hialuronidasa purificada fue de $8,1 \times 10^6$ UI/mg, medidas utilizando el procedimiento en la farmacopea china.

55

Ejemplo 10: Preparación de hialuronidasa (8)

[0139] El caldo de fermentación de la especie bacillus A50 (por ejemplo, el caldo de fermentación de uno cualquiera de los Ejemplos 3-9) se centrifugó a $4^\circ C$ para extraer las bacterias, y se recogió el sobrenadante. Al sobrenadante, se añadió

60

lentamente sulfato de amonio sólido en polvo hasta que su concentración fue de hasta el 20% p/v, el precipitado se extrajo por filtración, se añadió continuamente sulfato de amonio sólido en polvo al filtrado hasta que su concentración fue de hasta el 40% p/v, y el precipitado se recogió por filtración. El precipitado se disolvió en una solución tampón de Na_2HPO_4 -ácido cítrico con pH de 4,5, a fin de obtener una solución de enzima en bruto. La solución de enzima en bruto se cargó a una bolsa de diálisis con un corte de peso molecular de $3,0 \times 10^3$ Da, se colocó en una solución tampón de Na_2HPO_4 -ácido cítrico con pH de 4,5, y se dializó a 4°C durante la noche. La solución en la bolsa de diálisis se sometió a separación por cromatografía de intercambio iónico, el relleno de la columna cromatográfica fue medio FF con gel de agarosa DEAE, gradiente de elución se realizó con solución de NaCl 0-0,05 M, y se recogieron los picos de elución. El eluyente recogido finalmente se sometió a electroforesis SDS-PAGE para detectar los efectos de separación y purificación. Los resultados de la electroforesis se muestran como carril 1 en la figura 1: la pureza de la hialuronidasa fue del 97,6%. Paralelamente, el eluyente proteasa diana finalmente recogido se sometió a liofilización al vacío para obtener un polvo blanco como la hialuronidasa. La hialuronidasa obtenida tiene una actividad específica de $1,3 \times 10^7$ UI/mg.

Ejemplo 11: Preparación de hialuronidasa (9)

[0140] El caldo de fermentación de la especie bacillus A50 (por ejemplo, el caldo de fermentación de uno cualquiera de los Ejemplos 3-9) se centrifugó a 4°C para extraer las bacterias, y se recogió el sobrenadante. Al sobrenadante, se añadió lentamente sulfato de amonio sólido en polvo hasta que su concentración fue de hasta el 25% p/v, el precipitado se extrajo por filtración, se añadió continuamente sulfato de amonio sólido en polvo al filtrado hasta que su concentración fue de hasta el 40% p/v, y el precipitado se recogió por filtración. El precipitado se disolvió en una solución tampón de Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 50 mM con pH de 6,5, a fin de obtener una solución de enzima en bruto. La solución de enzima en bruto se cargó a una bolsa de diálisis con un corte de peso molecular de $1,0 \times 10^4$ Da, se colocó en una solución tampón de Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 50 mM con pH de 6,5, y se dializó a 4°C durante la noche. La solución en la bolsa de diálisis se sometió a separación por cromatografía de intercambio iónico, el relleno de la columna cromatográfica fue medio FF con gel de agarosa DEAE, gradiente de elución se realizó con solución de NaCl 0-0,05 M, y se recogieron los picos de elución. El eluyente recogido finalmente se sometió a electroforesis SDS-PAGE para detectar los efectos de separación y purificación. Los resultados de la electroforesis se muestran como carril 2 en la figura 1: la pureza de la hialuronidasa fue del 98,1%. Paralelamente, el eluyente proteasa diana finalmente recogido se sometió a liofilización al vacío para obtener un polvo blanco como la hialuronidasa. La hialuronidasa obtenida tiene una actividad específica de $1,4 \times 10^7$ UI/mg.

Ejemplo 12: Preparación de la hialuronidasa (10)

[0141] El caldo de fermentación de la especie bacillus A50 (por ejemplo, el caldo de fermentación de uno cualquiera de los Ejemplos 3-9) se centrifugó a 4°C para extraer las bacterias, y se recogió el sobrenadante. Al sobrenadante, se añadió lentamente sulfato de amonio sólido en polvo hasta que su concentración fue de hasta el 20% p/v, el precipitado se extrajo por filtración, se añadió continuamente sulfato de amonio sólido en polvo al filtrado hasta que su concentración fue de hasta el 40% p/v, y el precipitado se recogió por filtración. El precipitado se disolvió en una solución tampón de Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 50 mM con pH de 8,0, a fin de obtener una solución de enzima en bruto. La solución de enzima en bruto se cargó a una bolsa de diálisis con un corte de peso molecular de $1,4 \times 10^4$ Da, se colocó en una solución tampón de Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 50 mM con pH de 8,0, y se dializó a 4°C durante la noche. La solución en la bolsa de diálisis se sometió a separación por cromatografía de intercambio iónico, el relleno de la columna cromatográfica fue medio FF con gel de agarosa DEAE, gradiente de elución se realizó con solución de NaCl 0-0,05 M, y se recogieron los picos de elución. El eluyente recogido finalmente se sometió a electroforesis SDS-PAGE para detectar los efectos de separación y purificación. Los resultados de la electroforesis se muestran como carril 3 en la figura 1: la pureza de la hialuronidasa fue del 97,5%. Paralelamente, el eluyente proteasa diana finalmente recogido se sometió a liofilización al vacío para obtener un polvo blanco como la hialuronidasa. La hialuronidasa obtenida tiene una actividad específica de $1,4 \times 10^7$ UI/mg.

[0142] La hialuronidasa de la presente invención tiene una actividad enzimática elevada, buena estabilidad térmica y estabilidad del pH, se puede cumplir el requisito de dosificación de la enzima para la degradación industrial de ácido hialurónico a gran escala, y el procedimiento para la preparación de la enzima es simple, con condiciones moderadas y bajo coste, y supera los inconvenientes, tales como la contaminación ambiental de la degradación química, la limitación de fuente de enzimas de la degradación biológica, así como una baja actividad y alto coste.

[0143] Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular a través de procedimiento de digestión enzimática usando la hialuronidasa con actividad enzimática de 8×10^6 - $1,5 \times 10^7$ IU/mg de la presente invención.

Ejemplo 13: Preparación de hialuronato de sodio oligomérico

[0144] A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m^3 , se añadió 1 m^3 de agua purificada, se añadieron 300 kg de hialuronato sódico con un peso molecular de 2×10^4 Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar

completamente disuelto, el pH se ajustó a 4,0 con ácido acético glacial, se elevó la temperatura a 20°C, se añadieron 1,35X10¹⁰ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 3), se continuó la enzimólisis hasta que el peso molecular era de menos de 10⁴ Da (durante el período, con muestreo de forma continua y detección mediante el procedimiento GPC-MALLS), la temperatura se elevó a 50°C y se mantuvo durante 60 minutos, se añadió 1 kg de NaCl, la solución de la enzimólisis se filtró con una membrana de filtración mixta de 0,45 µm, a continuación, se utilizaron 20 m³ de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio oligomérico. El hialuronato de sodio oligomérico eran gránulos blancos, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 96,8%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 97,5%; tenía un peso molecular de 8,6 kDa, pH 6,8. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 2 (C), que estaba en consonancia con el espectro estándar de la figura 2(A) de la Farmacopea Europea (la muestra del espectro estándar de la Farmacopea Europea no estaba degradada).

Ejemplo 14: Preparación de hialuronato de potasio oligomérico

[0145] A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 10 kg de hialuronato de potasio con un peso molecular de 3X10⁶ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, el pH se ajustó a 9,0 con hidróxido de sodio, se elevó la temperatura a 48°C, se añadieron 4X10⁸ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 4), se continuó la enzimólisis hasta que el peso molecular era de menos de 10⁴ Da, la temperatura se elevó a 90°C y se mantuvo durante 10 minutos, se añadieron 100 kg de NaCl, la solución de la enzimólisis se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 µm, a continuación, se utilizaron 5 m³ de cetona para la precipitación para obtener hialuronato de sodio precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de potasio oligomérico. El hialuronato de potasio oligomérico era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 98,8%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 98,3%; tenía un peso molecular de 3,2 kDa, pH 6,5. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 2 (D), que estaba en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea.

Ejemplo 15: Preparación de hialuronato de sodio oligomérico

[0146] A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 30 kg de hialuronato de sodio con un peso molecular de 1,6X10⁶ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, el pH se ajustó a 8,0 con hidróxido de potasio, se elevó la temperatura a 40°C, se añadieron 1,2X10⁹ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 5), se continuó la enzimólisis hasta que el peso molecular era de menos de 10⁴ Da, la temperatura se elevó a 60°C y se mantuvo durante 60 minutos, se añadieron 50 kg de NaCl, la solución de la enzimólisis se filtró con una membrana de filtración de nylon de 0,45 µm, a continuación, se utilizaron 10 m³ de propanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio precipitado, el precipitado se deshidrató con propanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio oligomérico. El hialuronato de sodio oligomérico era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 97,6%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 97,8%; su peso molecular era de 6,2 kDa, pH era 7,1. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 2 (E), que estaba en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea.

Ejemplo 16: Preparación de hialuronato de calcio oligomérico

[0147] A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 60 kg de hialuronato de calcio con un peso molecular de 8X10⁵ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, el pH se ajustó a 7,0 con ácido acético glacial, se elevó la temperatura a 35°C, se añadieron 2,4X10⁹ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 6), se continuó la enzimólisis hasta que el peso molecular era de menos de 10⁴ Da, la temperatura se elevó a 70°C y se mantuvo durante 30 minutos, se añadieron 35 kg de CaCl₂, la solución de la enzimólisis se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 µm, a continuación, se utilizaron 3 m³ de isopropanol para la precipitación para obtener hialuronato de calcio precipitado, el precipitado se deshidrató con isopropanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de calcio oligomérico. El hialuronato de calcio oligomérico era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 96,6%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 97,3%; su peso molecular era de 5,6 kDa, pH era 6,5. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 2(F), que estaba en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea.

Ejemplo 17: Preparación de hialuronato de sodio oligomérico

[0148] A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 200 kg de hialuronato de sodio con un peso molecular de 2X10⁵ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, el pH se ajustó a 6,0 con ácido sulfúrico, se elevó la temperatura a 25°C, se añadieron 8X10⁹ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 7), se continuó la enzimólisis hasta que el peso molecular era de

menos de 10^4 Da, la temperatura se elevó a 80°C y se mantuvo durante 20 minutos, se añadieron 60 kg de NaCl, la solución de la enzimólisis se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de $0,45\ \mu\text{m}$, a continuación, se utilizaron $6\ \text{m}^3$ de metanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio precipitado, el precipitado se deshidrató con metanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio oligomérico. El hialuronato de sodio oligomérico era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 98,7%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 98,3%; su peso molecular era de 7,6 kDa, pH era 7,3. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 2(G), que estaba en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea.

Ejemplo 18: Preparación de hialuronato de zinc oligomérico

[0149] A un tanque de disolución de acero inoxidable de $1\ \text{m}^3$, se añadió $1\ \text{m}^3$ de agua purificada, se añadieron 100 kg de hialuronato de sodio con un peso molecular de 10^5 Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, el pH se ajustó a 5,0 con hidróxido de sodio, se elevó la temperatura a 20°C , se añadieron 4×10^9 UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 8), se continuó la enzimólisis hasta que el peso molecular era de menos de 10^4 Da, la temperatura se elevó a 55°C y se mantuvo durante 40 minutos, se añadieron 20 kg de ZnCl_2 , la solución de la enzimólisis se filtró con una membrana de filtración de nitrocelulosa de $0,45\ \mu\text{m}$, a continuación, se utilizaron $4,5\ \text{m}^3$ de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de zinc precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de zinc oligomérico. El hialuronato de zinc oligomérico era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 96,8%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 97,6%; su peso molecular era de 9,1 kDa, pH era 6,8. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 2(H), que estaba en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea.

Ejemplo 19: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular (1)

[0150] A un tanque de disolución de acero inoxidable de $1\ \text{m}^3$, se añadió $1\ \text{m}^3$ de agua purificada, se añadió 1 kg de hialuronato de sodio con un peso molecular de 3×10^6 Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 48°C , el pH se ajustó a 9,0 con hidróxido de sodio, se añadieron 10^7 UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 9) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 50°C y se mantuvo durante 60 minutos. Se añadieron 2 kg de NaCl, la filtración se realizó con un núcleo de filtración de polipropileno de $0,45\ \mu\text{m}$ después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizó $1\ \text{m}^3$ de acetona para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con acetona, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 98,3%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 98,5%; su peso molecular era de 931 kDa.

Ejemplo 20: Preparación de hialuronato de potasio de bajo peso molecular

[0151] A un tanque de disolución de acero inoxidable de $1\ \text{m}^3$, se añadió $1\ \text{m}^3$ de agua purificada, se añadieron 20 kg de hialuronato de potasio con un peso molecular de 1×10^6 Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 20°C , el pH se ajustó a 4,0 con ácido acético glacial, se añadieron 10^8 UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 7) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 90°C y se mantuvo durante 10 minutos. Se añadieron 100 kg de KCl, la filtración se realizó con un núcleo de filtración de polipropileno de $0,45\ \mu\text{m}$ después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizaron $10\ \text{m}^3$ de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de potasio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de potasio de bajo peso molecular. El hialuronato de potasio de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 96,8%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 97,5%; su peso molecular era de 15 kDa.

Ejemplo 21: Preparación de hialuronato de zinc de bajo peso molecular

[0152] A un tanque de disolución de acero inoxidable de $1\ \text{m}^3$, se añadió $1\ \text{m}^3$ de agua purificada, se añadieron 12 kg de hialuronato de sodio con un peso molecular de $1,61 \times 10^6$ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 45°C , el pH se ajustó a 5,0 con ácido acético glacial, se añadieron 2×10^7 UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 8) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 80°C y se mantuvo durante 20 minutos. Se añadieron 40 kg de ZnCl_2 , la filtración se realizó con un núcleo de filtración de poliéter sulfona de $0,45\ \mu\text{m}$ después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizaron $3\ \text{m}^3$ de metanol para la precipitación para obtener hialuronato de zinc de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con metanol, a continuación se secó

al vacío para obtener el hialuronato de zinc de bajo peso molecular. El hialuronato de zinc de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 98,5%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 98,2%; su peso molecular era de 754 kDa.

5 Ejemplo 22: Preparación de hialuronato de potasio de bajo peso molecular

10 **[0153]** A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 10 kg de hialuronato de potasio con un peso molecular de 1,77X10⁶ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 38°C, el pH se ajustó a 6,0 con ácido fosfórico, se añadieron 5X10⁷ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 9) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 60°C y se mantuvo durante 30 minutos. Se añadieron 30 kg de K₂SO₄, la filtración se realizó con un núcleo de filtración de poliéter sulfona de 0,45 µm después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizaron 5 m³ de isopropanol para la precipitación para obtener hialuronato de potasio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con isopropanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de potasio de bajo peso molecular. El hialuronato de potasio de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 96,3%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 97,3%; su peso molecular era de 421 kDa.

20 Ejemplo 23: Preparación de hialuronato de magnesio de bajo peso molecular

25 **[0154]** A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 8 kg de hialuronato de magnesio con un peso molecular de 2,55X10⁶ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 42°C, el pH se ajustó a 5,5 con ácido sulfúrico, se añadieron 3X10⁷ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 6) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 55°C y se mantuvo durante 30 minutos. Se añadieron 60 kg de MgCl₂, la filtración se realizó con un núcleo de filtración de polipropileno de 0,45 µm después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizaron 2,5 m³ de propanol para la precipitación para obtener hialuronato de magnesio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con propanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de magnesio de bajo peso molecular. El hialuronato de magnesio de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 97,2%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 98,1%; su peso molecular era de 538 kDa.

30 Ejemplo 24: Preparación de hialuronato de calcio de bajo peso molecular

35 **[0155]** A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 5 kg de hialuronato de calcio con un peso molecular de 2,46X10⁶ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 40°C, el pH se ajustó a 7,0 con ácido acético glacial, se añadieron 5X10⁷ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 5) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 65°C y se mantuvo durante 40 minutos. Se añadieron 50 kg de CaCl₂, la filtración se realizó con un núcleo de filtración de polipropileno de 0,45 µm después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizaron 4,5 m³ de acetona para la precipitación para obtener hialuronato de calcio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con acetona, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de calcio de bajo peso molecular. El hialuronato de calcio de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 98,1%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 98,2%; su peso molecular era de 205 kDa.

45 Ejemplo 25: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular

50 **[0156]** A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 2 kg de hialuronato de sodio con un peso molecular de 2,78X10⁶ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 35°C, el pH se ajustó a 6,5 con ácido acético glacial, se añadieron 2X10⁷ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 4) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 58°C y se mantuvo durante 50 minutos. Se añadieron 70 kg de Na₂SO₄, la filtración se realizó con un núcleo de filtración de nitrocelulosa de 0,45 µm después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizaron 4,8 m³ de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 98,6%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 98,3%; y su peso molecular era de 332 kDa.

60

Ejemplo 26: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular

5 **[0157]** A un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se añadió 1 m³ de agua purificada, se añadieron 15 kg de hialuronato de sodio con un peso molecular de 1,41X10⁶ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 43°C, el pH se ajustó a 8,0 con hidróxido de sodio, se añadieron 4X10⁷ UI de hialuronidasa de bacillus (preparada en el Ejemplo 3) bajo agitación para la enzimólisis. La enzimólisis se continuó hasta que se consiguió el peso molecular deseado; la temperatura se elevó a 65°C y se mantuvo durante 40 minutos. Se añadieron 80 kg de NaCl, la filtración se realizó con un núcleo de filtración de polisulfona de 0,45 µm después de estar completamente disuelto, a continuación, se utilizaron 8 m³ de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido medido mediante el procedimiento HPLC era de 98,2%; su contenido medido mediante el procedimiento de carbazol era de 99,1%; y su peso molecular era de 38 kDa.

15 Ejemplo 27: Uso de hialuronidasa en la preparación de sulfato de condroitina de bajo peso molecular

20 **[0158]** En un tanque de disolución de acero inoxidable de 1 m³, se preparó 1 m³ de solución de tampón fosfato de pH 6,0, se añadieron 50 kg de sulfato de condroitina con un peso molecular de 5X10⁴ Da bajo agitación al tanque de disolución, después de estar completamente disuelto, la temperatura se controló a 37°C, se añadieron 9X10⁸ UI de hialuronidasa de bacillus (por ejemplo, la hialuronidasa tal como se prepara en cualquiera de los Ejemplos 3-9), la enzimólisis se continuó hasta que el peso molecular era de 5000 Da; la temperatura se elevó a 50°C y se mantuvo durante 60 minutos, la solución de enzimólisis se filtró con un núcleo de filtración de 0,45 µm, a continuación, se utilizaron 20 m³ de etanol para la precipitación para obtener sulfato de condroitina de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el sulfato de condroitina de bajo peso molecular. El sulfato de condroitina de bajo peso molecular era un polvo blanco, su contenido era de 95,8%; su peso molecular era de 5,1 kDa y su pH era de 6,8

30 Ejemplo Comparativo 1: Preparación de hialuronato de sodio oligomérico mediante el procedimiento de degradación química (1)

35 **[0159]** A un vaso de precipitados de 1 litro, se añadió 1 litro de agua purificada, se añadieron 50 g de hialuronato sódico con un peso molecular de 8X10⁵ Da bajo agitación al vaso de precipitados, después de disolverse completamente, se añadieron 10 ml de ácido clorhídrico concentrado, cuando la degradación se procesó hasta que el peso molecular era de menos de 10⁴ Da, el pH se ajustó a 6,2 con hidróxido de sodio, la solución de degradación se filtró con una membrana de filtración de celulosa mixta de 0,45 µm, a continuación, se usaron 10 litros de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio oligomérico. El hialuronato de sodio oligomérico era polvo de color amarillo claro, su contenido medido por el procedimiento HPLC era de 63,8%; su contenido medido por el procedimiento de carbazol era de 98,9%; su peso molecular era de 8,1 kDa, pH era 4,8. Su espectro infrarrojo se muestra en la figura 2(B), que no estaba en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea.

45 Ejemplo comparativo 2: Preparación de hialuronato de sodio oligomérico mediante el procedimiento de degradación química (2)

50 **[0160]** A un vaso de precipitados de 1 litro, se añadió 1 litro de agua purificada, se añadieron 100 g de hialuronato sódico con un peso molecular de 5X10⁵ Da bajo agitación al vaso de precipitados, después de disolverse completamente, se añadieron 10 ml de ácido clorhídrico concentrado, cuando la degradación se procesó hasta que el peso molecular era de menos de 10⁴ Da, el pH se ajustó a 6,5 con hidróxido de sodio, la solución de degradación se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 µm, a continuación, se usaron 10 litros de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio oligomérico. El hialuronato de sodio oligomérico era polvo de color amarillo claro, su contenido medido por el procedimiento HPLC era de 60,2%; su contenido medido por el procedimiento de carbazol era de 99,2%; su peso molecular era de 7,6 kDa, pH era 4,2.

55 Ejemplo comparativo 3: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular mediante el procedimiento de degradación química (1)

60 **[0161]** A un vaso de precipitados de 1 litro, se añadió 1 litro de agua purificada, se añadieron 10 g de hialuronato sódico con un peso molecular de 1X10⁶ Da bajo agitación al vaso de precipitados, después de disolverse completamente, se añadieron 5g de hidróxido de sodio, la temperatura se elevó a 65°C, cuando la degradación se procesó hasta que se

consiguió el peso molecular deseado, el pH se ajustó a 6,5 con ácido acético glacial, la solución de degradación se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 μm , a continuación, se usaron 5 litros de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era polvo de color amarillo claro, su contenido medido por el procedimiento HPLC era de 68,2%; su contenido medido por el procedimiento de carbazol era de 97,5%; su peso molecular era de 15 kDa, pH era 6,9.

Ejemplo comparativo 4: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular mediante el procedimiento de degradación química (2)

[0162] A un vaso de precipitados de 1 litro, se añadió 1 litro de agua purificada, se añadieron 15 g de hialuronato sódico con un peso molecular de $1,41 \times 10^6$ Da bajo agitación al vaso de precipitados, después de disolverse completamente, se añadieron 6 g de hidróxido de sodio, la temperatura se elevó a 65°C, cuando la degradación se procesó hasta que se consiguió el peso molecular deseado, el pH se ajustó a 6,2 con ácido clorhídrico, la solución de degradación se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 μm , a continuación, se usaron 4 litros de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era polvo de color amarillo claro, su contenido medido por el procedimiento HPLC era de 70,5%; su contenido medido por el procedimiento de carbazol era de 96,8%; su peso molecular era de 39,2 kDa, pH era 6,4.

Ejemplo comparativo 5: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular mediante el procedimiento de degradación química (3)

[0163] A un vaso de precipitados de 1 litro, se añadió 1 litro de agua purificada, se añadieron 8 g de hialuronato sódico con un peso molecular de $1,61 \times 10^6$ Da bajo agitación al vaso de precipitados, después de disolverse completamente, se añadieron 6 g de hidróxido de sodio, la temperatura se elevó a 60°C, cuando la degradación se procesó hasta que se consiguió el peso molecular deseado, el pH se ajustó a 6,8 con ácido acético glacial, la solución de degradación se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 μm , a continuación, se usaron 4 litros de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era polvo de color amarillo claro, su contenido medido por el procedimiento HPLC era de 73,2%; su contenido medido por el procedimiento de carbazol era de 98,5%; su peso molecular era de 330 kDa, pH era 6,2.

Ejemplo comparativo 6: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular mediante el procedimiento de degradación química (4)

[0164] A un vaso de precipitados de 1 litro, se añadió 1 litro de agua purificada, se añadieron 5 g de hialuronato sódico con un peso molecular de $2,25 \times 10^6$ Da bajo agitación al vaso de precipitados, después de disolverse completamente, se añadieron 5 g de hidróxido de sodio, la temperatura se elevó a 60°C, cuando la degradación se procesó hasta que se consiguió el peso molecular deseado, el pH se ajustó a 6,6 con ácido acético glacial, la solución de degradación se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 μm , a continuación, se usaron 2 litros de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era polvo de color amarillo claro, su contenido medido por el procedimiento HPLC era de 89,9%; su contenido medido por el procedimiento de carbazol era de 96,8%; su peso molecular era de 530 kDa, pH era 7,5.

Ejemplo comparativo 7: Preparación de hialuronato de sodio de bajo peso molecular mediante el procedimiento de degradación química (5)

[0165] A un vaso de precipitados de 1 litro, se añadió 1 litro de agua purificada, se añadieron 4 g de hialuronato sódico con un peso molecular de $2,46 \times 10^6$ Da bajo agitación al vaso de precipitados, después de disolverse completamente, se añadieron 4 g de hidróxido de sodio, la temperatura se elevó a 60°C, cuando la degradación se procesó hasta que se consiguió el peso molecular deseado, el pH se ajustó a 6,2 con ácido clorhídrico, la solución de degradación se filtró con una membrana de filtración de polisulfona de 0,45 μm , a continuación, se usaron 3 litros de etanol para la precipitación para obtener hialuronato de sodio de bajo peso molecular precipitado, el precipitado se deshidrató con etanol, a continuación se secó al vacío para obtener el hialuronato de sodio de bajo peso molecular. El hialuronato de sodio de bajo peso molecular era polvo de color amarillo claro, su contenido medido por el procedimiento HPLC era de 95,8%; su contenido medido por el procedimiento de carbazol era de 98,5%; su peso molecular era de 770 kDa, pH era 7,6.

Ejemplo Experimental 1: Comparación de la estructura de hialuronatos oligoméricos preparados mediante enzimólisis

(digestión enzimática) y mediante degradación química

5 **[0166]** Todos de ácido hialurónico oligomérico o ácido hialurónico de bajo peso molecular, así como el ácido hialurónico normal, consisten en unidades repetitivas de disacárido de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico, de modo que sus contenidos fueron iguales a su contenido de disacáridos, el ácido hialurónico oligomérico o ácido hialurónico de bajo peso molecular o ácido hialurónico normal podrían ser degradados en disacáridos con hialuronidasa de bacillus, el contenido de disacárido se podría determinar por el procedimiento de HPLC con el fin de obtener el contenido de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular. Paralelamente, el contenido de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular también se determinó por el procedimiento de carbazol. Si la estructura de ácido hialurónico o sales del mismo estaba rota, la hialuronidasa no rompería el enlace glucosídico de las partes rotas, de modo que esto daría lugar a la disminución del contenido de disacárido. Cuanto mayor es la diferencia de los valores medidos entre el procedimiento de HPLC y el procedimiento de carbazol, mayores son las partes rotas de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular.

15 **[0167]** Un procedimiento específico también se puede leer en la solicitud de patente china, con número de publicación de CN102323344A, cuyos contenidos se incorporan en la presente invención por referencia.

[0168] Por ejemplo, la HPLC podría realizarse mediante las siguientes etapas:

20 a. solución de control estándar: se pesó una cantidad de control estándar (sal de sodio ΔDiHa de disacárido de ácido hialurónico, H9649, Sigma), se disolvió con solución de tampón fosfato (pH 6,0, 5 mmol/l) para formular una solución de 1 mg/ml, y obtener así la solución de control estándar;

25 b. pretratamiento de la muestra: se pesó una cantidad de muestra a ensayar (preparada mediante los Ejemplos Comparativos 1-7, Ejemplos 13-26), se disolvió con solución de tampón fosfato (pH 6,0, 5 mmol/l) para formular una solución de 1 mg/ml. Se añadió 1 ml de solución de muestra con 1000 UI de hialuronidasa (puede prepararse mediante los Ejemplos 10-12), se sometió a un baño de agua a 42°C durante 2 h; después de enzimólisis, la solución de enzimólisis se puso a ebullición durante 2 minutos para inactivar la enzima, y de este modo se obtiene una solución de enzimólisis de la muestra.

La solución de enzimólisis de la muestra se transfirió a un matraz volumétrico de 20 ml, se añadió con fase móvil a escala, se mezcló uniformemente, y se filtró para obtener una solución a ensayar.

30 c. tratamiento de la solución de control estándar: 1 ml de solución de control estándar se diluyó con fase móvil 20 veces, y se filtró para el uso en espera.

35 d. condiciones de cromatografía: se utilizó una columna de análisis de sacáridos para llevar a cabo una medición de cromatografía líquida de alto rendimiento; fase móvil era una solución de 0,4 mol/l NaH₂PO₄; velocidad de flujo era de 0,6 ml/min; temperatura de la columna era de 35°C; longitud de onda de detección era 232 nm; y tamaño de la muestra era de 20 µl;

e. cálculo de resultados: se usó cromatografía líquida de alto rendimiento para realizar la separación de cromatografía de control estándar y de la muestra a ensayar, respectivamente, y se calculó el área del pico de disacárido de ácido hialurónico mediante un procedimiento estándar externo; específicamente, usando la siguiente fórmula para calcular el contenido de ácido hialurónico oligomérico o sales del mismo:

contenido de ácido hialurónico:

$$45 \quad C (\%) = \frac{A_x \times C_R \times 100}{A_x \times W_x \times (100-h)} \times 100\%$$

A_x: área del pico del disacárido de ácido hialurónico de la muestra a ensayar;

A_R: área del pico del disacárido de ácido hialurónico del control estándar;

W_x: cantidad de la muestra a ensayar, mg;

50 C_R: concentración de la solución de control estándar, mg/ml;

h (%) es la pérdida por secado de la muestra a ensayar.

[0169] La comparación de contenido de hialuronatos oligoméricos obtenidos en el Ejemplo Comparativo 1-2 y el Ejemplo 13-18 se mostraron en la Tabla 1.

55

Tabla 1: Contenido de hialuronatos oligoméricos

	Ejemplo comparativo		Ejemplo					
	1	2	13	14	15	16	17	18
Contenido	63,8	60,2	96,8	98,8	97,6	96,6	98,7	96,8

(procedimiento HPLC, %)								
Contenido (procedimiento carbazol, %)	98,9	99,2	97,5	98,3	97,8	97,3	98,3	97,6
Diferencia de contenido (%)	35,1	39	0,7	0,5	0,2	0,7	0,4	0,8

[0170] Se puede observar en la Tabla 1 que hay diferencias relativamente grandes de contenido de hialuronatos oligoméricos preparados mediante el procedimiento de degradación química tal como se mide por el procedimiento de HPLC y el procedimiento de carbazol, mientras que no hay diferencias significativas de contenido de hialuronatos oligoméricos preparados mediante el procedimiento de enzimólisis tal como se mide por el procedimiento de HPLC y el procedimiento de carbazol, es decir, son más pequeñas que el 1%. Esto indica que los hialuronatos de oligoméricos preparados por el procedimiento de enzimólisis tienen una estructura íntegra, mientras que la estructura de hialuronatos preparados por el procedimiento de degradación química en gran parte está rota.

5

[0171] Paralelamente, los espectros de infrarrojos muestran que el hialuronato oligomérico preparado por el procedimiento de digestión enzimática está en consonancia con el espectro estándar de la Farmacopea Europea, mientras que los hialuronatos de oligoméricos preparados por el procedimiento de degradación química son significativamente diferentes del espectro estándar de la Farmacopea Europea a un número de ondas alrededor de 1610 cm^{-1} , lo que indica que la estructura de los hialuronatos oligoméricos preparados por el procedimiento de degradación química se rompe, mientras que los hialuronatos oligoméricos preparados por el procedimiento de digestión enzimática están íntegros.

10

Ejemplo Experimental 2: Comparación de la estructura de hialuronatos de bajo peso molecular preparados por enzimólisis (digestión enzimática) y por la degradación química

[0172] La comparación de los contenidos de hialuronatos de bajo peso molecular obtenidos en el Ejemplo comparativo 3-7 y el Ejemplo 19-26 se mostraron en las Tablas 2-3.

20

[0173] Las etapas específicas referidas al Ejemplo Experimental 1.

25

Tabla 2: Contenido de los hialuronatos de bajo peso molecular (Ejemplo Comparativo 3-7)

Ejemplo comparativo	3	4	5	6	7
Peso molecular (kDa)	15	39,2	330	530	770
Contenido (procedimiento HPLC, %)	68,2	70,5	73,2	89,9	95,8
Contenido (procedimiento carbazol, %)	97,5	96,8	98,5	96,8	98,5
Diferencia de contenido (%)	29,3	26,3	25,3	6,9	2,7

Ejemplo	20	26	24	25	22	23	21	19
Peso molecular (kDa)	15	38	205	332	421	538	754	931
Contenido (procedimiento HPLC, %)	96,8	98,2	98,1	98,6	96,3	97,2	98,5	98,3
Contenido (procedimiento carbazol, %)	97,5	99,1	98,2	98,3	97,3	98,1	98,2	98,5
Diferencia de contenido (%)	0,7	0,9	0,1	0,3	1,0	0,9	0,3	0,2

[0174] Puede verse a partir de las Tablas 2 y 3 que cuando el peso molecular de hialuronato de bajo peso molecular

preparado por el procedimiento de degradación química era inferior a 770.000, la diferencia de contenido tal como se mide mediante dos procedimientos aumentó con la disminución del peso molecular; mientras que la diferencia de contenido tal como se mide mediante dos procedimientos era siempre muy pequeña cuando el peso molecular de hialuronato de bajo peso molecular preparado por el procedimiento de enzimólisis cambiaba, es decir, todos menos del 1%. Este fenómeno muestra que la estructura de ácido hialurónico de bajo peso molecular preparado por el procedimiento de enzimólisis es íntegra; mientras que cuando el peso molecular del ácido hialurónico de bajo peso molecular preparado por el procedimiento de degradación química era inferior a 770.000, menor es el peso molecular y mayor es el grado del daño de la estructura.

[0175] El hialuronato oligomérico obtenido por degradación enzimática animal tiene actividades biológicas, tales como la promoción de la angiogénesis, la promoción de la cicatrización de heridas, la lucha contra los tumores y la regulación del sistema inmunitario. No se han descrito actividades biológicas de hialuronato oligomérico obtenido por la degradación hialuronidasa de origen bacteriano. Sin embargo, las siguientes investigaciones experimentales muestran que los hialuronatos oligoméricos obtenidos en la presente invención están libres de citotoxicidad, y en comparación con el hialuronato oligomérico obtenido por el procedimiento de degradación química, tienen efectos potentes en la captación de radicales libres, potente capacidad de reducción, efectos potentes en protección solar y reparación posterior a quemadura solar, y por lo tanto pueden ser utilizados en cosméticos; los hialuronatos oligoméricos tienen un peso molecular pequeño, y son propensos a la absorción intestinal, por lo tanto pueden ser utilizados en alimentos; paralelamente, los hialuronatos oligoméricos tienen funciones en la promoción de la angiogénesis y promoción de la cicatrización de heridas, por lo tanto pueden ser utilizados en el campo de los medicamentos.

[0176] Tampoco se han notificado actividades biológicas de hialuronato de bajo peso molecular obtenido mediante la degradación de hialuronidasa de origen microbiano. Sin embargo, los ejemplos anteriores 19-26 muestran que los hialuronatos de bajo peso molecular preparados por digestión enzimática tienen una estructura íntegra, y los siguientes investigadores experimentales muestran que los hialuronatos de bajo peso molecular obtenidos en la presente invención tienen potentes efectos en la captación de radicales libres, potente capacidad de reducción, potentes efectos en la protección solar y reparación posterior a quemadura solar, y por lo tanto pueden ser utilizados en cosméticos y medicinas; y los hialuronatos de bajo peso molecular también se pueden utilizar en los alimentos, para mantener la lubricidad y la elasticidad de la piel.

Ejemplo Experimental 3: Efectos de la temperatura sobre la actividad de la hialuronidasa y pruebas de estabilidad térmica de hialuronidasa

[0177] Se utilizó solución tampón de fosfato con pH 6,0 para preparar una solución de HA con una concentración final de 2 mg/ml, se tomaron 9,9 ml y se usaron como solución de sustrato, y se añadieron 100 µl de solución de hialuronidasa diluida apropiadamente (siempre que el valor de absorción a 232 nm sea de 0,3-0,7) (por ejemplo, la hialuronidasa preparada en cualquiera de los Ejemplos 3-12), la reacción en baño de agua se realizó a diferentes temperaturas durante 30 minutos, a continuación se puso a ebullición durante 2 minutos, la solución de enzima diluida preinactivada se utilizó como control, cuando se enfriaron hasta temperatura ambiente, se midieron los valores de absorción a 232nm (estos valores representaban la actividad de hialuronidasa), y los resultados se muestran en la figura 3(a), en la que la temperatura de reacción más apropiada fue de 42°C.

[0178] La solución de hialuronidasa se mantuvo a temperatura constante de 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, respectivamente, para diferentes períodos de tiempo, a continuación, se midieron las actividades enzimáticas residuales, y los resultados se muestran en la figura 3(B): la actividad enzimática fue relativamente estable a 40°C y 45°C, y casi no cambio en 6 horas, lo que demuestra que la actividad de hialuronidasa era muy estable a 45°C o por debajo, y que podía satisfacer los requisitos de la producción industrial a temperatura ambiente.

Ejemplo Experimental 4: Efectos del pH sobre la actividad de la hialuronidasa y la prueba de la estabilidad de pH de hialuronidasa

[0179] Se prepararon soluciones tampón de pH 1,0-pH 12,0, respectivamente, y estas soluciones tampón se utilizaron para preparar las soluciones de 2 mg/ml de ácido hialurónico con un pH correspondiente, se tomaron soluciones de 9,9 ml de HA de diferente pH por separado y se usaron como solución sustrato, y se añadieron 100 µl de solución de hialuronidasa apropiadamente diluida (siempre que el valor de absorción a 232 nm sea de 0,3-0,7) (por ejemplo, la hialuronidasa preparada en cualquiera de los Ejemplos 3-12), la reacción en baño de agua se realizó durante 30 minutos, a continuación se puso a ebullición durante 2 minutos, la solución de enzima diluida preinactivada se utilizó como control, cuando se enfriaron hasta temperatura ambiente, se midieron los valores de absorción a 232 nm, y los resultados se muestran en la Figura 4 (a): el pH más adecuado para la enzima fue 6,5, y la enzima no tenía actividad cuando el pH ≤ 4,0 o pH ≥ 9,0.

[0180] La hialuronidasa (por ejemplo, la hialuronidasa preparado en cualquiera de los Ejemplos 3-12) se diluyó

apropiadamente con soluciones tampón con diferentes pH, a continuación, se midieron las actividades enzimáticas residual, y los resultados se muestran en la Figura 4(B): la actividad de la enzima fue relativamente estable a un pH de 5,0-6,0, que casi no disminuyó en 6 horas.

5 [0181] Se puede observar que la hialuronidasa de la presente invención tiene una actividad enzimática alta, buena estabilidad térmica y estabilidad del pH, puede satisfacer los requisitos de cantidad de enzima para la degradación industrial de ácido hialurónico a gran escala, y el procedimiento para la preparación de la enzima es simple, moderado en condiciones, de bajo coste, y supera inconvenientes, tales como la contaminación ambiental de la degradación química, limitación de la fuente de enzima de la degradación biológica, actividad baja y alto precio.

10 Ejemplo Experimental 5: Análisis de la especificidad de sustrato de la enzima

15 [0182] Se prepararon por separado soluciones de sulfato de condroitina, alginato sódico, heparina sódica, quitosano, quitina y carboximetilcelulosa de sodio con una concentración final de 10 mg/ml con solución de tampón fosfato de pH 6,0, de cada uno se tomaron 9,9 ml como solución de sustrato, y se añadieron 100 µl de solución de hialuronidasa apropiadamente diluida (siempre que el valor de absorción a 232 nm sea de 0,3-0,7) (por ejemplo, la hialuronidasa preparada en cualquiera de los Ejemplos 3-12), la reacción en baño de agua se realizó a 42°C durante 30 minutos, a continuación se puso a ebullición durante 2 minutos, la solución de enzima diluida preinactivada se utilizó como control, cuando se enfriaron hasta temperatura ambiente, se midieron los valores de absorción a 232 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Especificidad de sustrato de hialuronidasa

Sustrato	A ₂₃₂
Sulfato de condroitina	1,0813
alginato sódico	0
Heparina sódica	0
Quitosano	0
Quitina	0
Carboximetilcelulosa sódica	0

25 [0183] Los resultados mostraron que la hialuronidasa puede romper catalíticamente el ácido hialurónico, así como actuar sobre el sulfato de condroitina, pero no puede degradar el alginato de sodio, heparina sódica, quitosano, quitina y carboximetil celulosa sódica.

30 Ejemplo Experimental 6: Comparación de la citotoxicidad de hialuronatos oligoméricos preparados mediante el procedimiento de degradación química y el procedimiento de digestión enzimática

35 [0184] El experimento utilizó células de fibroblastos de ratón L929 (adquiridas del Cell Bank of the Committee on Type Culture Collection de la Academia de Ciencias de China) como células de observación, se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 añadido con suero bovino fetal al 10% como medio completo, el control negativo fue el medio completo sin ninguna muestra a ensayar, el control positivo era una solución de fenol de 5 g/l (disuelta en el medio completo), el control en blanco era de medio completo de células libres, y la muestra a ensayar era medio completo añadido con una muestra de hialuronato sódico oligomérico. Después de cultivar durante 72 h, la tasa de crecimiento relativo (RGR) se calculó mediante la siguiente fórmula.

40

$$\text{RGR (\%)} = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

45 en la que:

RGR-tasa de crecimiento relativo, %;
 A- absorbancia del grupo de muestra a ensayar (el grupo negativo, el grupo positivo), con deducción del blanco;
 A₀- absorbancia del grupo de control negativo, con deducción del blanco.

50 [0185] El grado de citotoxicidad se determinó según la norma de clasificación RGR en la Tabla 5. Cuando el grupo de control positivo era una reacción de al menos grado 3 y el grado de citotoxicidad de reacción de la muestra no era mayor de grado 2, se consideró que su citotoxicidad era aceptable.

Tabla 5: Grados de reacción de citotoxicidad (según la Farmacopea de Estados Unidos)

Grado	0	1	2	3	4
RGR(%)	≥100	80-99	50-79	30-49	0-29

5

Tabla 6: Resultados experimentales de citotoxicidad de hialuronato de sodio oligomérico

Muestra	Concentración de muestra (% p/v)	DO ₅₇₀ (X ± SD)	RGR (%)	Grado de citotoxicidad
Ejemplo comparativo 1	0,25	0,762 ± 0,062	84,36	1
	0,5	0,681 ± 0,092	74,43	2
	1,0	0,629 ± 0,057	68,14	2
	2,0	0,452 ± 0,052	46,61	3
	3,0	0,357 ± 0,023	35,14	3
	4,0	0,193 ± 0,024	15,21	4
Ejemplo 13	0,25	0,985 ± 0,063	110,94	0
	0,5	1,147 ± 0,059	130,43	0
	1,0	1,075 ± 0,041	121,74	0
	2,0	0,929 ± 0,095	104,21	0
	3,0	0,646 ± 0,038	70,20	2
	4,0	0,471 ± 0,039	49,19	3
Ejemplo 14	0,25	1,012 ± 0,057	113,58	0
	0,5	1,107 ± 0,044	124,24	0
	1,0	0,998 ± 0,045	112,01	0
	2,0	0,935 ± 0,026	104,94	0
	3,0	0,742 ± 0,030	83,28	1
	4,0	0,520 ± 0,030	58,36	2
Ejemplo 15	0,25	0,898 ± 0,060	100,79	0
	0,5	0,997 ± 0,045	111,90	0
	1,0	0,925 ± 0,038	103,82	0
	2,0	0,832 ± 0,041	93,38	1
	3,0	0,605 ± 0,058	67,90	2
	4,0	0,450 ± 0,049	50,51	2
Ejemplo 16	0,25	1,015 ± 0,029	113,92	0
	0,5	1,090 ± 0,035	122,33	0
	1,0	0,985 ± 0,038	110,55	0
	2,0	0,886 ± 0,055	99,44	1
	3,0	0,721 ± 0,032	80,92	1
	4,0	0,489 ± 0,033	54,88	2
Ejemplo 17	0,25	0,932 ± 0,054	104,60	0
	0,5	1,005 ± 0,067	112,79	0
	1,0	0,974 ± 0,051	109,32	0
	2,0	0,889 ± 0,055	99,78	1
	3,0	0,719 ± 0,042	80,70	1
	4,0	0,530 ± 0,039	59,48	2
Ejemplo 18	0,25	1,033 ± 0,055	115,94	0
	0,5	1,213 ± 0,048	136,14	0
	1,0	1,098 ± 0,029	123,23	0
	2,0	0,980 ± 0,028	109,99	0
	3,0	0,726 ± 0,030	81,48	1
	4,0	0,501 ± 0,037	56,23	2
control negativo		0,891 ± 0,030	100,00	0
control positivo		0,071 ± 0,43	0,43	4

[0186] Los resultados muestran que el hialuronato de sodio oligomérico preparado por el procedimiento de degradación química no es citotóxico cuando su concentración no es mayor que 1,0%; mientras que el hialuronato de sodio oligomérico preparado por el procedimiento de digestión enzimática no es citotóxico cuando su concentración no es mayor que

10

3,0%. En comparación con el hialuronato de sodio oligomérico del procedimiento de degradación química, el hialuronato de sodio oligomérico con la misma concentración preparado por el procedimiento de digestión enzimática tiene efectos significativos en la promoción de la proliferación celular ($p < 0,05$).

5 Ejemplo Experimental 7: Estudio sobre la absorción transdérmica, la actividad antioxidante y la capacidad de reducción del hialuronato preparado mediante el procedimiento de digestión enzimática

1. Estudio sobre la absorción transdérmica de hialuronato oligomérico preparado por el procedimiento de digestión enzimática

10 **[0187]** Se fijó material de piel de ratones sin pelo en la celda de difusión de un instrumento absorción transdérmica, se añadió una solución al 0,5% de hialuronato oligomérico (preparada por separado en los Ejemplos 13-18) a la parte dadora de la celda de difusión, se tomó la muestra cada 3 horas y se midió el contenido de hialuronato oligomérico en la solución recibida. Los resultados se muestran en la Figura 5(A). Este diagrama muestra que el hialuronato de oligomérico podía entrar en el interior de la piel y ser absorbido.

2. Estudio sobre la actividad antioxidante de hialuronato oligomérico y hialuronato de bajo peso molecular

20 **[0188]** Los hialuronatos oligoméricos y hialuronatos de bajo peso molecular preparados mediante el procedimiento de digestión enzimática y el procedimiento de degradación química se estudiaron por separado preliminarmente sobre su capacidad de captación de radicales libres DPPH y su capacidad de reducción.

[0189] Los reactivos y cepas celulares utilizadas fueron los siguientes:

25 **[0190]** Hialuronato con diferentes pesos moleculares:

Hialuronatos oligoméricos por digestión enzimática: preparados en los Ejemplos 13-18;

Hialuronatos oligoméricos por procedimiento químico: preparados de acuerdo con los Ejemplos Comparativos 1-2;

Hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática: preparados en los Ejemplos 19-26;

Hialuronatos de bajo peso molecular por procedimiento químico: preparados en los Ejemplos Comparativos 3-7;

30 Hialuronato de sodio de alto peso molecular (peso molecular: 1610.000, HA-1610k): producido por Huaxi Furuida Biological Medicine Co., Ltd.

1) Estudio sobre la capacidad de captar radicales libres

35 **[0191]** El mecanismo para medir la capacidad de captar radicales libres DPPH: la difenil-picrilhidrazina (DPPH) era un radical libre estable con el centro de nitrógeno, la solución en metanol o etanol de DPPH era de color violeta, tenía un máximo de absorbancia a la longitud de onda de 510-530 nm, y su concentración estaba en relación lineal con su absorbancia. Cuando había captador de radicales libres, el captador de radicales libres proporcionaba 1 electrón para emparejar el par de electrones solitarios de DPPH y por lo tanto resulta en la pérdida de color, y el grado de pérdida de color está en relación cuantitativa con los electrones recibidos, es decir, el color de la solución cambió la luz, y la absorbancia se redujo (Alisi, CS, et al., Free radical scavenging and in-vitro antioxidant effects of ethanol extract of the medicinal herb Chromolaena odorata Linn. British Journal of Pharmaceutical Research, 2011,1 (4), 141 -155.). Cuanto mayor sea la capacidad del captador de radicales libres, menor es la absorbancia. 5,0 ml de solución etanólica de 0,1 mM de DPPH (2-metil-2,3-dihidro-5,6-difenilpirazina) y 5,0 ml de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular con diferentes concentraciones se dosificaron por separado con precisión, se colocaron en tubos de ensayo adaptados y se mezclaron uniformemente. La solución mezclada isométrica de agua y etanol al 95% se utilizó como control de blanco. Después de reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, los valores de absorbancia de la luz de la solución se midieron por separado a 523 nm.

50
$$\text{tasa de captación (\%)} = \frac{\text{absorbancia después de la reacción de HA y DPPH}}{\text{absorbancia de DPPH solo}}$$

55 **[0192]** Los resultados experimentales de hialuronatos oligoméricos se muestran en la figura 5(B), y se puede observar que en comparación con los hialuronatos de sodio oligoméricos por degradación química (preparados en el Ejemplo Comparativo 1 o Ejemplo Comparativo 2), los hialuronatos de sodio oligoméricos por digestión enzimática (preparados en los Ejemplos 13-18) de la misma concentración tenían una mayor capacidad de captación de radicales libres DPPH, $p < 0,05$.

60 **[0193]** Los resultados experimentales de los hialuronatos de bajo peso molecular se muestran en la figura 5(C).

[0194] El diagrama mostró que la capacidad de captar radicales libres aumentó con la disminución del peso molecular en los hialuronatos de bajo peso molecular por degradación química o hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática. Sin embargo, con respecto a los hialuronatos de bajo peso molecular con un peso molecular similar, los hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática tenían mayor capacidad de captar los radicales libres en comparación con hialuronatos de bajo peso molecular por degradación química. Los hialuronatos con peso molecular superior a 1000.000 casi no tenían la capacidad de captar radicales libres.

2) Medición de la capacidad de reducción

[0195] Mecanismo para la medición de la capacidad de reducción: el ferricianuro de potasio en medio ácido débil de pH 6,6 podía reducirse por la sustancia reductora para generar hexacianoferrato de potasio $K_4Fe(CN)_6$, que reaccionó adicionalmente con ion férrico proporcionado por $FeCl_3$ para generar el azul de Prusia ($Fe_4[K_4Fe(CN)_6]_3$), que tenía absorbancia específica a 700 nm, y mediante el uso de la cantidad de producción de azul de Prusia como índice, cuanto mayor es la absorbancia, mayor es la capacidad de reducción. Por lo tanto, cuando se usó una solución acuosa de hialuronato como materia prima, su capacidad de reducción podría calificarse mediante la medición de la cantidad de azul de Prusia generado en este sistema (Oyaizu, M. Antioxidant activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44, 307-315).

[0196] Se midieron con precisión 2,5 ml de solución de cada uno de los hialuronatos oligoméricos (preparados en los Ejemplos 13-18) y hialuronatos de bajo peso molecular (preparados en los Ejemplos 19-26), así como 2,5 ml de solución de fosfato y se colocaron en tubos de ensayo adaptados, respectivamente, se añadieron 2,5 ml de solución de ferricianuro de potasio al 1,0%, se mezclaron uniformemente, y se trataron con un baño de agua a 50°C durante 20 minutos. Después del tratamiento del baño de agua, se enfriaron rápidamente, se añadieron 2,5 ml de solución de ácido tricloroacético al 10%, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Se recogieron 8 ml de sobrenadante y se añadieron 5 ml de agua y 1 ml de la solución de tricloruro férrico al 0,1%, y se usó agua isométrica como blanco de control para reemplazar la solución de tricloruro férrico. Después de reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se midieron los valores de absorbancia de la solución a 700 nm.

[0197] Los resultados de la capacidad de reducción de hialuronatos oligoméricos se muestran en la Figura 5(D), y el diagrama muestra que en comparación con los hialuronatos oligoméricos de degradación química (preparados en el Ejemplo Comparativo 1 o Ejemplo Comparativo 2), los hialuronatos oligoméricos de digestión enzimática de la misma concentración tenían mayor capacidad de reducción, $p < 0,05$.

[0198] Los resultados de la capacidad de reducción de hialuronatos de bajo peso molecular se muestra en la figura 5(E), y este diagrama muestra que con la disminución del peso molecular, la capacidad de reducción aumentó tanto en la hialuronatos de bajo de peso molecular por degradación química o hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática. Sin embargo, con respecto a hialuronatos de bajo peso molecular con peso molecular similar, los hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática tenían mayor capacidad de reducción en comparación con hialuronatos de bajo peso molecular por degradación química. Los hialuronatos con peso molecular superior a 1000.000 casi no tenían capacidad de reducción.

[0199] Los resultados experimentales anteriores mostraron que los hialuronatos oligoméricos por digestión enzimática (por ejemplo, hialuronato de sodio oligomérico) y hialuronatos de bajo peso molecular (por ejemplo, hialuronato de sodio de bajo peso molecular) tenían mayor capacidad de captación de radicales libres DPPH y mayor capacidad de reducción en comparación con los hialuronatos oligoméricos de degradación química (por ejemplo, hialuronato de sodio oligomérico) y hialuronatos de bajo peso molecular (por ejemplo, hialuronato de sodio de bajo peso molecular), y por lo tanto podrían captar eficazmente los radicales libres en el cuerpo humano, reducir la formación de melanina, y podrían ser utilizados en cosmética para proporcionar funciones tales como la protección contra el sol, la reparación posterior a quemadura solar, blanqueamiento y brillo, antienvjecimiento; también podrían ser utilizados en alimentos para el cuidado de la salud y alimentos normales para proporcionar funciones de captación de radicales libres en el cuerpo y antienvjecimiento; y también podrían ser utilizados en medicamentos para combatir los daños causados por los radicales libres en el cuerpo.

Ejemplo Experimental 8: Estudio sobre las funciones de hialuronatos por digestión enzimática en los alimentos para el cuidado de la salud

1. Estudio sobre las funciones de hialuronatos oligoméricos por digestión enzimática en los alimentos para el cuidado de la salud

[0200] Por ejemplo, en una solución oral de cuidado de la salud con hialuronato oligomérico como componente funcional principal, la cantidad de la hialuronato oligomérico añadido fue de 0,05-2%. La formulación de la solución oral fue de:

adición de hialuronato oligomérico al 0,5% (preparada en cualquiera de los Ejemplos 13-18), a continuación, adición con 25% de azúcar comestible o miel de abeja, y disolución con agua purificada. Después de completar la disolución, la esterilización se llevó a cabo mediante el uso de un dispositivo de ultrafiltración, a continuación, se vertió en botellas de 10 ml para solución oral (esterilizadas con alta temperatura o de ozono ultravioleta), se taparon y se sellaron, y todas las operaciones anteriores se llevaron a en una zona limpia. A continuación, el producto se sometió a la prueba de calidad para obtener la solución oral de hialuronato oligomérico. Los sujetos tenían una edad de 30-65, se dividieron en 6 grupos, 30 personas en cada grupo, y cada persona fue administrada con 10-20 ml de solución oral de hialuronato oligomérico por día, durante un mes consecutivo, y los efectos se muestran en la Tabla 7. Otras 30 personas se utilizaron como grupo de control, a las que se les administró con una solución de azúcar comestible o miel por día.

5

10

Tabla 7: Efectos de la administración de solución oral de hialuronato oligomérico

Muestra	Punto de evaluación	Cambio significativo	Cambio ligero	Sin cambio
Ejemplo 13	1. piel es lisa, húmeda y elástica	24	5	1
	2. mejillas rosadas, reducción de arrugas, juvenil	17	8	5
	3. mayor resistencia, no fácil enfermar	23	4	3
	4. relación corporal y sano, no fácil fatigarse	12	13	5
5Ejemplo 14	1. piel es lisa, húmeda y elástica	25	4	1
	2. mejillas rosadas, reducción de arrugas, juvenil	21	6	3
	3. mayor resistencia, no fácil enfermar	22	5	3
	4. relación corporal y sano, no fácil fatigarse	14	11	5
Ejemplo 15	1. piel es lisa, húmeda y elástica	22	5	3
	2. mejillas rosadas, reducción de arrugas, juvenil	19	7	4
	3. mayor resistencia, no fácil enfermar	21	5	4
	4. relación corporal y sano, no fácil fatigarse	13	12	5
Ejemplo 16	fatiga			
	1. piel es lisa, húmeda y elástica	23	5	2
	2. mejillas rosadas, reducción de arrugas, juvenil	17	9	4
	3. mayor resistencia, no fácil enfermar	22	5	3
Ejemplo 17	4. relación corporal y sano, no fácil fatigarse	14	11	5
	1. piel es lisa, húmeda y elástica	24	4	2
	2. mejillas rosadas, reducción de arrugas, juvenil	18	8	4
	3. mayor resistencia,	23	5	2

	no fácil enfermar			
	4. relación corporal y sano, no fácil fatigarse	13	13	4
Ejemplo 18	1. piel es lisa, húmeda y elástica	21	7	2
	2. mejillas rosadas, reducción de arrugas, juvenil	19	6	5
	3. mayor resistencia, no fácil enfermar	20	7	3
	4. relación corporal y sano, no fácil fatigarse	12	12	6
Grupo de control	1. piel es lisa, húmeda y elástica	1	7	22
	2. mejillas rosadas, reducción de arrugas, juvenil	0	7	23
	3. mayor resistencia, no fácil enfermar	0	3	27
	4. relación corporal y sano, no fácil fatigarse	1	6	23

5 [0201] Se puede ver en la Tabla 7 que el hialuronato de sodio oligomérico se podía comer directamente como un alimento para el cuidado de la salud, muy fácil para la absorción, y tenía muchas funciones, tales como la mejora de la inmunidad, retraso de la senescencia, restauración del brillo y elasticidad de la piel. Los hialuronatos oligoméricos de la presente invención tienen un peso molecular pequeño, pueden ser absorbidos por el intestino de los seres humanos, a fin de aumentar el contenido de ácido hialurónico en los tejidos del cuerpo, suministrar a la piel ácido hialurónico que puede disminuir debido al envejecimiento. Además, el ácido hialurónico de peso molecular pequeño absorbido por la administración oral puede generar el ácido hialurónico de alto peso molecular en el cuerpo de modo que la piel se convertiría en tierna y suave, las articulaciones se vuelven flexibles, se evitaría la formación de arrugas, y por lo tanto pueden ser utilizados en el campo de los alimentos.

2. Estudio de las funciones de hialuronatos de bajo peso molecular en alimentos para el cuidado de la salud

15 [0202] Por ejemplo, en una solución oral para el cuidado de la salud con hialuronato de bajo peso molecular como componente funcional principal, la cantidad de hialuronato de bajo peso molecular añadido fue de 0,05-2%. La formulación de la solución oral fue de: adición de hialuronato de bajo peso molecular al 1,0% (preparado en cualquiera de los Ejemplos 19-26), a continuación, adición de azúcar comestible al 25% o miel de abeja. Procedimiento de formulación: realización de la formulación en una habitación limpia, toma y agitación de agua purificada a temperatura ambiente, adición en proporción de hialuronato de bajo peso molecular, a continuación, adición con el azúcar comestible o miel de abeja bajo agitación hasta la disolución completa, adición de agua hasta 100 %. Después de la disolución completa, la esterilización se realizó por esterilización con calor húmedo, a continuación se vertió en botellas de 10 ml de solución oral (esterilizadas con alta temperatura u ozono ultravioleta), se taparon y se sellaron, y todas las operaciones anteriores se llevaron en una zona limpia. A continuación, el producto se sometió a la prueba de calidad para obtener la solución oral de hialuronato de bajo peso molecular. Los sujetos tenían una edad de 22-55, se dividieron en 8 grupos, de 32 personas en cada grupo, y a cada persona se le administraron 20 ml de solución oral de hialuronato de bajo peso molecular por día, durante un mes consecutivo. Otras 30 personas se utilizaron como grupo de control, a los que se les administró una solución de azúcar comestible o miel de abeja por día.

30 [0203] El contenido de humedad de la piel y la cantidad de pérdida de agua de los sujetos se midieron con un medidor de humedad de la piel por personas designadas antes y después de la administración, en las que los sitios de medición y la temperatura ambiente y la humedad se mantuvieron constantes antes y después de la medición. Los resultados de la medición del contenido de humedad de la piel humana se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados de la medición del contenido de humedad de la piel

Muestra	Contenido de humedad	Cantidad de pérdida de
---------	----------------------	------------------------

		(%)	agua (%)
Ejemplo 19	Antes de la administración	28,86 ± 1,55	9,23 ± 0,85
	Después de la administración	39,77 ± 1,94	6,51 ± 0,64
Ejemplo 20	Antes de la administración	27,54 ± 1,51	9,15 ± 0,80
	Después de la administración	36,72 ± 1,75	6,92 ± 0,55
Ejemplo 21	Antes de la administración	25,69 ± 1,68	9,86 ± 0,81
	Después de la administración	33,78 ± 1,54	6,67 ± 0,51
Ejemplo 22	Antes de la administración	28,27 ± 1,55	10,06 ± 0,78
	Después de la administración	37,82 ± 1,75	7,39 ± 0,58
Ejemplo 23	Antes de la administración	25,26 ± 1,55	9,93 ± 0,75
	Después de la administración	35,30 ± 1,94	7,58 ± 0,52
Ejemplo 24	Antes de la administración	22,47 ± 1,58	10,43 ± 0,87
	Después de la administración	32,56 ± 1,83	7,01 ± 0,66
Ejemplo 25	Antes de la administración	24,78 ± 1,48	10,03 ± 0,82
	Después de la administración	35,43 ± 1,94	7,35 ± 0,44
Ejemplo 26	Antes de la administración	22,16 ± 1,44	9,83 ± 0,79
	Después de la administración	33,72 ± 1,85	6,71 ± 0,67
Grupo de control	Antes de la administración	29,11 ± 1,78	9,45 ± 0,75
	Después de la administración	28,65 ± 1,66	8,89 ± 0,81

[0204] Se puede ver en la Tabla 8 que los grupos de sujetos mostraron un aumento significativo del contenido de humedad y una mejora significativa de la pérdida de agua después de 1 mes de la administración de hialuronato de bajo peso molecular en comparación con antes de la administración. Se observó que las personas de grupos de sujetos mostraron un mejor brillo, compacidad y elasticidad de la piel en comparación con el grupo control. Por lo tanto, la administración oral de ácido hialurónico de bajo peso molecular es fácil para la absorción, tiene buena retención de humedad y efectos hidratantes, puede activar las células de la piel, y por lo tanto tiene una función antienvjecimiento.

[0205] Por lo tanto, después de la administración oral de hialuronato oligomérico o hialuronato de bajo peso molecular, el brillo, la elasticidad de la piel de los sujetos podría mejorar, y podrían utilizarse en alimentos para el cuidado de la salud, así como alimentos normales.

Ejemplo Experimental 9: Estudio sobre los efectos de la digestión enzimática de hialuronato oligomérico en la promoción de la angiogénesis

[0206] Se utilizaron pruebas de cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, proporcionadas por Shandong Province Academy of Medical Sciences) y pruebas de modelo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) (huevos para incubar se adquirieron del Poultry Institute of Shandong Province Academy of Agricultural Sciences) para estudiar si el hialuronato oligomérico por digestión enzimática (preparado en cualquiera de los Ejemplos 13-18) podría promover la angiogénesis. Los efectos de proliferación de HUVEC y efectos de angiogénesis de CAM se muestran en la Tabla 9. Las etapas experimentales podrían referirse a, por ejemplo, WANG Yanhou, WANG Fengshan, GUO Xueping, Preparation of relatively low molecular weight hyaluronic acid and effects thereof on promoting angiogenesis. Chinese Journal of bioquímica pharmaceuticals, 2007,28 (2): 107-109.

Tabla 9: Efectos de hialuronato de sodio oligomérico sobre la promoción de la angiogénesis

Grupo	Peso molecular (kDa)	Concentración (µg/ml)	Número de embriones de pollo (huevo)	Número de vasos de CAM (vasos)	Proliferación de HUVEC (DO ₅₇₀ nm)
Control blanco, solución salina normal	--	--	10	10,33 ± 3,67	0,402 ± 0,012
Ejemplo 13	8,6	10	10	13,75 ± 4,83	0,412 ± 0,011
		40	10	22,79 ± 4,52	0,435 ± 0,006
Ejemplo 14	3,2	10	10	18,71 ± 4,67	0,410 ± 0,010
		40	10	28,31 ± 4,56	0,455 ± 0,007
Ejemplo 15	6,2	10	10	17,32 ± 5,64	0,408 ± 0,013
		40	10	25,89 ± 3,51	0,447 ± 0,009
Ejemplo 16	5,6k	10	10	17,23 ± 3,42	0,413 ± 0,014
		40	10	26,58 ± 4,68	0,450 ± 0,004

Ejemplo 17	7,6 k	10	10	15,99 ± 5,04	0,402 ± 0,011
		40	10	23,24 ± 3,65	0,438 ± 0,005
Ejemplo 18	9,1 k	10	10	12,89 ± 4,61	0,409 ± 0,010
		40	10	22,48 ± 4,74	0,442 ± 0,007
Control positivo (bFGF*)	--	40 UI/ml	10	25,74 ± 3,67	0,475 ± 0,014

[0207] Los resultados experimentales mostraron que el hialuronato de sodio oligomérico tenía una actividad significativa de promoción de la angiogénesis, podía promover la angiogénesis de CAM in vivo, y podía promover la proliferación de células HUVEC in vitro, y podía ser utilizado en campos médicos, tales como la cicatrización de heridas.

5

Ejemplo Experimental 10: Estudio sobre los efectos de los hialuronatos en la reparación posterior a quemadura solar y protección contra el sol

[0208] Los rayos ultravioleta (que comprende principalmente los rayos UVA y UVB) en la luz del sol es un factor importante para causar quemaduras solares y envejecimiento por sol de la piel, así como cánceres de piel. Los tres tipos de células de la piel del cuerpo, es decir, queratinocitos, fibroblastos y melanocitos son sensibles a los rayos ultravioleta. El daño por UVA es principalmente causar daño oxidativo del ADN de fibroblastos de la piel, que pueden resultar en la aparición de la mutación del ADN y cánceres de piel. En este experimento, fibroblastos de ratón L929 (adquiridos en el Cell Bank of Committee on type Culture Collection of Chinese Academy of Sciences) fueron expuestos a cierta dosis de UVA, a continuación, las células fueron tratadas con hialuronato, con el fin de estudiar los efectos de hialuronatos preparados por diferentes procedimientos de degradación y hialuronatos con diferentes pesos moleculares en las células L929 expuestas a radiación UVA; y fibroblastos de ratón L929 fueron tratados con hialuronato, a continuación, las células se expusieron a una dosis de radiación UVA, con el fin de estudiar los efectos de los hialuronatos preparados por diferentes procedimientos de degradación y hialuronatos con diferentes pesos moleculares sobre la protección a la radiación UVA de células L929.

20

[0209] Los reactivos y cepas de células usados fueron los siguientes:
 cepa de células de fibroblastos L929: comprado en el Cell Bank of Committee on type Culture Collection of Chinese Academy of Sciences;

25

Hialuronatos con diferentes pesos moleculares:
 Hialuronatos oligoméricos por digestión enzimática: preparados en los Ejemplos 13-18;
 Hialuronatos oligoméricos por procedimiento químico: preparados de acuerdo con los Ejemplos Comparativos 1-2;
 Hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática: preparados en los Ejemplos 19-26;
 Hialuronatos de bajo peso molecular por procedimiento químico: preparados en los Ejemplos Comparativos 3-7;
 Hialuronato de sodio de alto peso molecular (peso molecular: 1610.000, HA-1610k): producido por Huaxi Furuida Biological Medicine Co., Ltd.

30

1. Estudio sobre los efectos reparadores de hialuronatos contra rayos ultravioleta

35

[0210] Los efectos reparadores de hialuronatos preparados por diferentes procedimientos de preparación y hialuronatos con diferentes pesos moleculares en células de fibroblasto de ratón L929 después de radiación UVA.

40

[0211] Se tomaron células L929 durante la fase de crecimiento logarítmico, se digirieron con enzima del páncreas, se ajustaron para tener una densidad celular de 2×10^4 /ml, se inocularon en placas de 96 pocillos de cultivo celular, 100 µl de suspensión celular por pocillo, se colocaron en incubadora de dióxido de carbono y se cultivaron 0a 37°C, 5% de CO₂ durante la noche. Los medios de cultivo se extrajeron de la placa de 96 pocillos, y se añadieron a continuación 100 µl de PBS a cada pocillo. El grupo de control negativo no se expuso a la radiación, mientras que las células L929 de todos los grupos de ensayo fueron expuestas a una radiación UVA de 7,2 J/cm². Se desechó el PBS después de la radiación y las células se trataron mediante las siguientes operaciones:

45

Grupo sin radiación (grupo de control negativo): añadido con 100 µl de medio de cultivo completo;
 grupo con radiación (grupo de control positivo): añadido con 100 µl de medio de cultivo completo;
 radiación + hialuronato: añadido con 100 µl de medio de cultivo completo que contiene hialuronato al 0,0625%;
 Después de 24 horas de cultivo continuo, se añadieron 20 µl de MTT a cada pocillo, y se continuó la incubación en la incubadora de cultivo celular durante 4 horas. Se descartó la solución de cultivo, se añadieron 150 µl de DMSO a cada pocillo, se agitaron en la oscuridad durante 10 minutos, y se midieron los valores de absorbancia de la luz a una longitud de onda de 570 nm con un instrumento de marcaje enzimático. La tasa de crecimiento relativo (RGR) de las células se calculó con la siguiente fórmula:

50

$$RGR (\%) = \frac{A_c}{\dots} \times 100\%$$

$$A_{c,0}$$

en la que A_c representa el valor de absorbancia del grupo de ensayo, $A_{c,0}$ representa el valor de absorbancia del grupo de control negativo.

5

[0212] Los resultados se muestran en la figura 6(A) y la figura 6 (B), los hialuronatos oligoméricos preparados por diferentes procedimientos de degradación y los hialuronatos con diferentes pesos moleculares todos tenían efectos reparadores de las células dañadas después de radiación UVA, en las que el hialuronato oligomérico por digestión enzimática tuvo los mejores efectos reparadores posteriores a quemadura, mientras que los efectos de los hialuronatos oligoméricos de degradación química eran los siguientes mejores. Además, con la disminución del peso molecular de hialuronato, los efectos reparatorios se hicieron mejores. Los hialuronatos oligoméricos por digestión enzimática y hialuronatos de bajo peso molecular tenía mejores efectos reparadores posteriores a quemadura que los de hialuronato de alto peso molecular.

10

15

2. Estudio sobre los efectos de protección ultravioleta de hialuronatos

[0213] Se estudiaron los efectos de protección de los hialuronatos oligoméricos preparados por diferentes procedimientos y hialuronatos con diferentes pesos moleculares contra la radiación UVA en células de fibroblastos de ratón L929.

20

[0214] En este experimento, los hialuronatos con diferentes pesos moleculares se aplicaron a la cepa L929 de células de fibroblastos de ratón, a continuación, las células fueron expuestas a cierta dosis de radiación UVA, y fueron estudiados los efectos de protección de los hialuronatos con diferentes pesos moleculares y hialuronatos oligoméricos preparados por diferentes procedimientos contra la radiación UVA en células de fibroblastos de ratón L929.

25

[0215] Se tomaron células durante la fase de crecimiento logarítmico, se digirieron con enzima del páncreas, se ajustaron para tener una densidad celular de 2×10^4 /ml, se inocularon en placas de 96 pocillos de cultivo celular, 100 μ l de suspensión celular por pocillo, se colocaron en incubadora de dióxido de carbono y se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ durante la noche. Los medios de cultivo se extrajeron después del cultivo durante la noche, y las células se trataron en grupos de la siguiente manera, y se incubaron en incubadora de cultivo celular durante 12 horas.

30

[0216] Grupo sin radiación (grupo de control negativo): añadido con 100 μ l de medio de cultivo completo; grupo con radiación (grupo de control positivo): añadido con 100 μ l de medio de cultivo completo; radiación + hialuronato: añadido con 100 μ l de medio de cultivo completo que contiene hialuronato al 0,0625%; Se descartó la solución de cultivo en la placa de 96 pocillos y se añadieron a continuación 100 μ l de PBS a cada pocillo. Excepto en el grupo sin radiación, las células L929 de todos los grupos de ensayo fueron expuestas a una radiación UVA de 7,2 J/cm². Se desechó el PBS después de la radiación, se añadieron 20 μ l de MTT a cada pocillo, y se continuó la incubación en la incubadora de cultivo celular durante 4 horas. Se descartó la solución de cultivo, se añadieron 150 μ l de DMSO a cada pocillo, se agitaron en la oscuridad durante 10 minutos, y se midieron los valores de absorbancia de la luz a una longitud de onda de 570 nm con un instrumento de marcaje enzimático. La tasa de crecimiento relativo (RGR) de las células se calculó con la siguiente fórmula:

35

40

$$\text{RGR (\%)} = \frac{A_c}{A_{c,0}} \times 100\%$$

45

en la que A_c representa el valor de absorbancia del grupo de ensayo, $A_{c,0}$ representa el valor de absorbancia del grupo de control negativo.

50

[0217] Los resultados se muestran en la figura 6(C) y la figura 6 (D), los hialuronatos oligoméricos preparados por diferentes procedimientos y los hialuronatos con diferentes pesos moleculares tenían todos efectos de protección contra la radiación UVA. El hialuronato oligomérico por digestión enzimática tenía mejores efectos de protección contra la radiación UVA, mientras que los efectos de los hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática fueron los siguientes mejores. Los hialuronatos oligoméricos y hialuronatos de alto peso molecular del procedimiento químico tenía peores efectos de protección.

55

[0218] En suma, los hialuronatos oligoméricos y hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática tenían todos efectos reparadores contra los rayos ultravioleta y efectos de protección contra los rayos ultravioleta, en los que los hialuronatos oligoméricos por digestión enzimática tenían mejor efectos de reparación contra los rayos ultravioleta y efectos de protección contra los rayos ultravioleta; los hialuronatos de bajo peso molecular tenían buenos efectos de protección contra los rayos ultravioleta, y sus efectos reparadores contra los rayos ultravioletas eran inferiores a los de los hialuronatos oligoméricos del procedimiento químico pero eran superiores a los del hialuronato de alto peso molecular. Por lo tanto, los

60

hialuronatos oligoméricos y hialuronatos de bajo peso molecular por digestión enzimática se podrían utilizar en cosméticos para la protección solar y para reparación posterior a quemadura solar.

5 [0219] Se puede observar a partir de lo mencionado anteriormente que los hialuronatos oligoméricos y los hialuronatos de bajo peso molecular obtenidos por los procedimientos de preparación de la presente invención pueden penetrar la capa epidérmica de la piel mediante uso externo, proporcionando nutrientes y humedad a la piel, previniendo del envejecimiento de la piel, previniendo del daño de los rayos ultravioleta, reparando las células de la piel quemadas por el sol, y por lo tanto se pueden utilizar en cosméticos; es fácilmente absorbible por administración oral, no sólo captan radicales libres, activan las células de la piel, mantienen la piel húmeda, sino que también tienen buenos efectos de mejora de la función inmunitaria y la función antienviejecimiento, y por lo tanto pueden ser utilizados en alimentos y productos para el cuidado de la salud. Además, tienen funciones de inducción de angiogénesis, activación inmunitaria celular y formación ósea, así como buenos efectos terapéuticos para la queratitis bacteriana, y por lo tanto se pueden utilizar en los campos de los medicamentos.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

[0220]

20 <110> Bloomage Freda Biopharm Co. Ltd.

<120> Bacillus, hialuronidasa y usos de los mismos

<130> IECl20067PCT

25 <160> 5

<170> PatentIn version 3.2

30 <210> 1

<211> 1418

<212> ADN

<213> bacillus sp.

35 <400> 1

g c g g t c g g c t c c t t a c g g t t a c c c c a c c g a c t t c g g g t g t t a c a a a c t c t c g t g g t g t g a 60

c g g g c g g t g t g t a c a a g g c c c g g a a c g t a t t c a c c g c g g c a t g c t g a t c c g c g a t t a c t 120

40 a g c g a t t c c g g c t t c a t g c a g g c g a g t t g c a g c c t g c a a t c c g a a c t g a g a a t g g t t t t a 180

t g g g a t t g g c t a a a c c t c g c g g t c t t g c a g c c t t t g t a c c a t c c a t t g t a g c a c g t g t g 240

t a g c c c a g g t c a t a a g g g g c a t g a t g a t t t g a c g t c a t c c c a c c t t c c t c g g t t t g t c 300

45 a c c g g c a g t c a c c t t a g a g t g c c c a a c t g a a t g c t g g c a a c t a a g a t c a a g g g t t g c g c t 360

c g t t g c g g g a c t t a a c c c a a c a t c t c a c g a c a c g a c t g a c g a c a c c a t g c a c c a c c t g 420

50 t c a c t c t g t c c c c g a a g g g g a a c g t c c t a t c t c t a g g a g t g t c a g a g g a t g t c a a g a c c 480

t g g t a a g g t t c t t c g c g t t g c t t c g a a t t a a a c c a c a t g c t c c a c c g c t t g t g c g g g c c c 540

c c g t c a a t t c c t t t g a g t t t c a g c c t t g c g g c c g t a c t c c c a g g c g g a g t g c t t a a t g c 600

55 g t t a g c t g c a g c a c t a a a g g g c g g a a a c c c t c t a a c a c t t a g c a c t c a t c g t t t a c g g c g 660

t g g a c t a c c a g g g t a t c t a a t c c t g t t t g c t c c c c a c g c t t t c g c g c c t c a g c g t a g t t 720

ES 2 665 556 T3

acagaccaga aagccgcctt cgccactggt gttcctccac atctctacgc atttcaccgc 780
 5 tacacgtgga attccgcctt cctcttctgt actcaagtcc ccagtttcc aatgaccctc 840
 cacggttgag ccgtgggctt tcacatcaga cttaaaggac cgctgcgcg cgctttacgc 900
 ccaataattc cggacaacgc ttgccaccta cgtattaccg cggctgctgg cacgtagtta 960
 10 gccgtggctt tctggtagg taccgtcaag gtaccggcag ttactccggt acttgttctt 1020
 ccctaacaac agagctttac gaccogaagg cttcatcgc tcacgcggcg ttgctccgtc 1080
 agactttcgt ccattgcgga agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt ctgggccgtg 1140
 15 tctcagtccc agtgtggccg atcacctct caggtcggct acgcatcgtc gccttggtga 1200
 gccgttacct caccaactag ctaatgcgcc gggggcccat ctgtaagtgt cagcgtaaac 1260
 20 cgactttcag cttttcctca tgagaggaaa aggattatcc ggtattagct ccggtttccc 1320
 gaagttatcc cagtcttaca ggcagggtgc ccacgtgta ctcacccgtc cgccgctaac 1380
 caagaggtgc aagcacctca agattcgctc gacttgca 1418
 25

<210> 2
 <211> 1106
 <212> PRT
 30 <213> secuencia artificial
 <400> 2

Asn Glu Ser Thr Leu Leu Leu Asn Thr Ser Phe Glu Glu Thr Glu Ala
 35 1 5 10 15

Pro Lys Ser Gly Trp Asp Gln Leu Gly Ala Pro Lys Trp Gly Val Trp
 40 20 25 30

Arg Pro Thr Gly Ser Pro Ile Val Thr Ile Thr Lys Glu Ala Ser Arg
 45 35 40 45

Thr Gly Glu Tyr Gly Leu Lys Ile Ala Ala Ala Gln Ser Ala Arg Ala
 50 50 55 60

Ala Val Ser Gln Asp Val Pro Val Gln Gly Gly Gln Thr Tyr Gln Leu
 55 65 70 75 80

Gly Thr Trp Leu Lys Thr Asp Asn Ile Val Ser Gly Gln Gly Ala Arg
 60 65 70 75 80 85 90 95

ES 2 665 556 T3

5 Leu Arg Val Val Leu Tyr Glu Gly Thr Gln Gln Leu Gly Leu Leu Tyr
 100 105 110
 Ser Ser Arg Leu Thr Gly Thr His Asp Trp Ser Gln Ile Lys Met Glu
 115 120 125
 10 Val Lys Thr Pro Ala Asn Ala Asp Ser Ile Arg Val Gln Leu Phe Phe
 130 135 140
 15 Glu Thr Gly Thr Gly Thr Ala Leu Phe Asp Asp Val Ser Leu Gln Leu
 145 150 155 160
 20 Ile Gln Pro Ala Thr Ser Ile Ala Ile Glu Glu Ser Glu Ile Thr Ile
 165 170 175
 25 Lys Glu Gln Glu Thr Gly Leu Leu His Ala Gln Met Val Pro Ala Asp
 180 185 190
 Ala Ser Ser Lys Val Ser Trp Val Ser Ala Asp Pro Ser Ile Ala Thr
 195 200 205
 30 Val Asp Asn Gly Lys Val Thr Gly Val Asn Pro Gly Gly Thr Thr Ile
 210 215 220
 35 Met Ala Phe Thr Asp Asn Gly Leu Ala Ala Thr Ser Thr Val Lys Val
 225 230 235 240
 40 Ile Lys Asn Asp Gly Ile Glu Arg Pro Glu Val Thr Gln Leu Asp Leu
 245 250 255
 45 Gln Pro Lys Glu Leu Glu Leu Gly Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Gln
 260 265 270
 Ala Ile Ile Ala Pro Ala Thr Ala Asp Ala Glu Lys Leu Val Trp Ser
 275 280 285
 50 Ser Ser Asn Glu Ala Val Ala Ser Ile Gln Lys Gly Leu Ile Glu Ala
 290 295 300
 55 Lys Ala Ser Gly Thr Ala Val Ile Thr Val Glu Thr Glu Asp Gly Ser

ES 2 665 556 T3

	305				310					315					320	
5	Leu	Lys	Ser	Glu	Ser	Gln	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Ala	Val	Val	Asp	Glu
					325					330					335	
10	Tyr	Asp	Gln	Leu	Arg	Lys	Lys	Trp	Lys	Ser	Leu	Met	Thr	Gly	Leu	Asp
				340					345					350		
15	Ser	Tyr	Asp	Pro	Thr	Asn	Val	Arg	Met	Asn	Glu	Met	Ile	Gln	Asn	Gln
			355					360					365			
20	Thr	Lys	Ser	Ala	Glu	Thr	Leu	Trp	Lys	Thr	Met	Phe	Lys	Asn	Asn	Asp
		370					375					380				
25	Arg	Ser	Phe	Leu	Trp	Ile	Asn	Phe	Ala	Ser	Thr	Asp	Asn	Ser	Ala	Asp
	385					390					395					400
30	Ile	Arg	Asp	Ser	Tyr	Arg	Asn	Leu	Thr	Thr	Met	Ala	Lys	Ala	Phe	Ala
				405						410					415	
35	Asn	Glu	His	Ser	Ser	Leu	Tyr	Arg	Asn	Pro	Gln	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile
			420						425					430		
40	Thr	Glu	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Tyr	Gln	Asn	Arg	Tyr	Asn	Glu	Ser	Ile
			435					440					445			
45	Ala	Gln	Tyr	Ser	Asn	Trp	Trp	His	Trp	Glu	Ile	Gly	Val	Pro	Asn	Glu
		450					455					460				
50	Leu	Asn	Ser	Leu	Met	Val	Leu	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Asp	Gln	Asp	Ser
	465					470					475					480
55	Ile	His	Arg	Tyr	Leu	Lys	Val	Val	Asp	His	Phe	Gln	Pro	Asp	Pro	Thr
					485					490					495	
60	Lys	Ser	Gly	Ala	Thr	Thr	Pro	Glu	Lys	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala
				500					505					510		
65	Asn	Arg	Ile	Asp	Val	Ser	Lys	Val	Val	Gly	Val	Arg	Gly	Val	Ile	Val
			515					520					525			

ES 2 665 556 T3

Lys Asp Ala Thr Lys Ile Ala Ala Ala Arg Asp Ala Leu Ser Gln Thr
 530 535 540
 5 Phe Glu Asn Val Thr Glu Gly Asp Gly Phe Tyr Glu Asp Gly Ser Phe
 545 550 555 560
 10 Val Gln His Glu Asn Ile Ala Tyr Asn Gly Ser Tyr Gly Ile Val Leu
 565 570 575
 15 Ile Glu Gly Leu Thr Asp Met Leu Glu Leu Leu Ser Asn Ser Thr Trp
 580 585 590
 20 Gln Val Thr Asp Pro Lys Val Thr Asn Val Tyr Asp Trp Ile Glu Thr
 595 600 605
 25 Ala Tyr Glu Pro Phe Met Tyr Lys Gly Ala Leu Met Asp Met Val Arg
 610 615 620
 30 Thr Ile Ile Lys Ser Val Ile Arg Met Ala Gln Phe Ala Pro Glu Pro
 645 650 655
 35 Tyr Ala Glu Lys Tyr Asn Ser Met Ala Lys Tyr Trp Leu Gln Glu Asp
 660 665 670
 40 Thr Tyr Leu Asp Tyr Phe Lys Asn Ala Gly Asn Phe Arg Asp Ile Thr
 675 680 685
 45 Leu Ala Lys Gln Leu Leu Glu Lys Gln Glu Val Thr Pro Arg Gly Asp
 690 695 700
 50 Lys Ser Gly Tyr Ala Phe Gly Ile Ser Met Tyr Ser Asn Arg Ile Gln
 725 730 735
 55 Asn Tyr Glu Asp Met Asn Asp Glu Asn Arg Lys Gly Trp Tyr Thr Gly
 740 745 750

ES 2 665 556 T3

Glu Gly Met Thr Tyr Leu Tyr Asn Gly Asp Leu Ala Gln Tyr Ser Asp
 755 760 765
 5
 Asp Phe Trp Pro Thr Val Asp Pro Tyr Arg Met Pro Gly Thr Thr Val
 770 775 780
 10
 Asp Thr Met Arg Arg Ala Asp Gly Ser Gly Glu His Arg Ser Ser Glu
 785 790 795 800
 15
 Ser Trp Thr Gly Gly Ser Thr Leu Lys Asn Phe Gly Ser Ala Gly Met
 805 810 815
 20
 Ser Tyr Asp Ala Trp Asn Ser Ser Leu Ile Ala Lys Lys Ser Trp Phe
 820 825 830
 Met Phe Asp Asn Glu Ile Val Ala Leu Gly Ala Gly Ile Thr Ser Ser
 835 840 845
 25
 Glu Asp Arg Asn Val Glu Ser Ile Val Glu Asn Arg Lys Ile Arg Asn
 850 855 860
 30
 Asp Gly Ser Asn Gln Leu Val Ile Asn Gly Glu Thr Leu Asn Leu Ser
 865 870 875 880
 35
 Asn Gly Gly Gln Asn Gln Thr Met Ala Ala Lys Trp Ala Phe Leu Glu
 885 890 895
 40
 Gly Asn Val Pro Gly Ala Asp Ile Gly Tyr Tyr Phe Pro Glu Gly Lys
 900 905 910
 Met Leu Thr Ile Lys Lys Glu Glu Arg Thr Gly Ala Trp Lys Asp Ile
 915 920 925
 45
 Asn Tyr Gly Gly Pro Ala Glu Ala Ile Lys Arg Ser Tyr Thr Thr Met
 930 935 940
 50
 Trp Phe Asp His Gly Val Arg Pro Glu Gln Asp Thr Tyr Ser Tyr Val
 945 950 955 960
 55
 Leu Leu Pro Gly Leu Asn Lys Glu Gln Thr His Gln Tyr Ser Gln Asn
 965 970 975

ES 2 665 556 T3

Pro Asp Ile Thr Ile Leu Arg Asn Asp Ser Ala Val Gln Ala Val Gln
 980 985 990
 5
 Asp Val Lys Glu Asn Ile Ile Gly Ala Asn Phe Trp Lys Asp Glu Lys
 995 1000 1005
 10
 Gln Ser Ala Gly Pro Leu Thr Val Tyr Gln Lys Ala Ser Val Thr
 1010 1015 1020
 15
 Met Gln Glu Lys Asp Gly Val Leu Glu Ile Ala Val Cys Asp Pro
 1025 1030 1035
 20
 Thr Met Glu Asn Lys Gly Ser Ile Glu Ile Glu Ile Asp Gly Lys
 1040 1045 1050
 25
 Ala Phe Lys Val Leu Glu Ala Asp Glu Ser Ile Thr Val Glu Asn
 1055 1060 1065
 30
 Thr Lys Pro Ser Ile Lys Leu Lys Val Asn Val Asn Glu Ala Lys
 1070 1075 1080
 35
 Gly Asn Ser Pro Asn Ser Ile Arg
 1100 1105
 40
 <210> 3
 <211> 3324
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 45
 <400> 3
 aatgaatcta ctttactatt gaatactagt tttgaagaga cggaggcgcc aaaatcaggc 60
 tgggatcaat taggtgcacc aaaatgggggt gtctggagac ctaccggaag cccattgta 120
 accattacaa aggaagcaag ccgtacgggt gagtatgggt taaaaattgc cgcgggcgcaa 180
 50
 tctgctagag ctgccgtgtc acaggatgta cctgttcagg gcgggcagac ctatcagtta 240
 ggcacctggc tgaagacaga taatatcgtc agcgggtcaag gggcgcggt gagggttggt 300
 55
 ttatatgaag gaaccagca gctgggctta ctttactctt caagattaac tgggaccac 360

ES 2 665 556 T3

	gattggtcgc	aaataaaaat	ggaggtaaag	actcctgcc	atgccgatag	catccgtgtc	420
5	cagcttttct	ttgaaacagg	aacgggtaca	gccctatttg	atgatgtttc	actgcagctc	480
	atccagccag	ctacgtcgat	tgctatcgaa	gaaagtgaaa	tcacatcaa	agagcaggaa	540
	acaggtttat	tgcatgcaca	gatggttcct	gctgatgcc	gctccaaagt	atcttgggtg	600
10	tcggcggatc	catcgattgc	caccgttgat	aacggtaagg	ttacgggtgt	aaatcccggg	660
	gggacaacga	ttatggcttt	taccgataac	gggcttgctg	ccactagtac	cgtaaaaagt	720
15	atcaaaaatg	atggtattga	acggccggag	gtaacacagt	tggatctaca	accaaaggaa	780
	ctcgagcttg	gatcagggtca	agtgcgattg	cttcaggcaa	ttatcgcacc	agccactgcc	840
	gatgcagaaa	agttggtatg	gagctcttcc	aatgaagcag	tcgcttctat	tcaaaaagga	900
20	cttattgaag	cgaaagcctc	aggaactgct	gtgattaccg	tagaaacgga	agatggcagc	960
	ttaaagagtg	aaagccagat	taccgttacc	gatgcagtcg	tagatgaata	tgatcaactt	1020
25	cggaaaaagt	ggaaaagcct	gatgactggt	cttgattcgt	acgacccgac	gaatgtgcgg	1080
	atgaacgaaa	tgattcagaa	ccagacaaaa	tcagcggaaa	ccctttggaa	aacaatgttt	1140
	aaaaataacg	atcgttcgtt	cttatggatt	aactttgcaa	gcactgacaa	ttcggctgat	1200
30	attcgcgaca	gctaccggaa	totaacgacc	atggctaaag	cgtttgccaa	tgaacactcc	1260
	agcctttatc	gaaatccgca	attgctaaag	gatatcacgg	aggcgctaga	gtggctgtac	1320
35	caaaatcgct	ataacgaaag	tattgctcaa	tatagcaatt	ggtggcattg	ggaaatcggg	1380
	gtcccgaatg	aattaacag	tttaatgggt	cttctatatg	attatttggg	tcaagatagt	1440
	attcatcgct	acttgaaagt	agtcgaccac	tttcaaccag	atccaacgaa	atccggagcc	1500
40	accactcccg	agaaataccg	ggaagctctt	ggcgccaatc	ggattgatgt	cagcaaggta	1560
	gtcgggtgtc	gaggggtaat	tgtgaaggac	gccacgaaaa	ttgcggctgc	acgagatgcc	1620
45	ctaagccaaa	cttttgaaaa	cgtaactgaa	ggagacgggt	tttatgaaga	tggtctcttc	1680
	gttcagcatg	agaatatcgc	ctataacggg	tcatacggca	ttgtcttaat	tgaaggcttg	1740
	actgacatgc	tcgaactctt	aagtaattct	acttggcaag	tgactgacct	taaggttacc	1800
50	aatgtttatg	actggattga	aactgcctat	gaaccattta	tgtataaagg	tgctttgatg	1860
	gatatggatg	gaggaagagc	gatttcacgt	aatttccttc	aggatcatca	ggctggacac	1920
55	accattatca	aaagtgtgat	tcgaatggca	caatttgctc	cagagccata	tgcagagaag	1980

ES 2 665 556 T3

	tataattcca tggcaaaata ctggcttcaa gaagatactt acctggatta ttttaaaaac	2040
	gcgggtaact tccgcgatat cactcttgca aagcagcttt tggaaaaaca agaggtcacc	2100
5	cctcgcggag atcttgatth tcataagact ttcgcctcca tggaccgggt tgtccacaga	2160
	aaatcgggct atgcgthttg tatkagtatg tattcaaaca ggattcaaaa ttatgaagac	2220
10	atgaatgatg aaaaccgcaa aggctggat accggagaag ggatgaccta cttatataat	2280
	ggtgacctcg ctcaatatag tgatgatttc tggccgacag tggaccgta ccggatgcca	2340
	gggacaacgg ttgatacgat gagacgagcg gatggaagtg gtgagcacag gtcgtcagag	2400
15	tcatggactg gcggttcaac cctaaagaat tttggthctg caggaatgtc ttatgatgct	2460
	tggaatagtt cattgattgc caaaaagtca tggthttatgt tcgataacga aatcgthtgc	2520
20	cttggthcag ggattactag cagtgaagac cggaatgtht agagtattgt cgaaaaccga	2580
	aagattcgaa atgacggttc caatcaattg gtcattcaatg gtgaaacgct gaatttaagc	2640
	aatgthggtc aaaaccaaac gatggccgct aatgthgctt thcttgaagg gaatgtccca	2700
25	ggagcagata ttgthtacta thtccagaa ggtaaaatgc tgacgattaa aaaagaagaa	2760
	cgtaccggtg catggaaaga tattaattat ggcgthccag ctgaagcgat caagcgatcc	2820
30	tacacaacga tgtgthttga ccatgthgtc cgtcctgagc aggatacgtc thcttatgth	2880
	ctattgthcag gthtaataa ggaacaaaca caccaatatt thcaaatcc tgatattacg	2940
	atthtacgaa atgattctgc tgtccaagcg gtacaagacg taaaggagaa tatcataggg	3000
35	gctaatthct ggaaggatga aaagcaaagt gctgthccgt taactgthta tcaaaaagcc	3060
	tccgtgacca tgcaggagaa ggatggagtc cthgagattg ctgtatgtga tccgacgatg	3120
40	gaaaacaagg gthctatcga aatcgaaatt gatggcaagg cgttcaaggth tttagaagcc	3180
	gatgaaagta tcacgthtaga aaatacgaag ccgtcaatca agthgaaggth caatgtgaat	3240
	gaggcaaaaag ggaaaacgth cacagcgaaa thgaaaatga thccgagcca aaagggcaat	3300
45	agcccgaact caatcagata ataa	3324
	<210> 4	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<400> 4	
55	agagthttgat cctggthcag	20

ES 2 665 556 T3

<210> 5
<211> 19
<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<400> 5
ggttaccttg ttacgactt

19

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Especie bacillus que tiene un número de acceso de depósito de CGMCC NO. 5744, fecha del depósito del 8 de febrero de 2012, y el nombre de la institución depositaria de China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC).
2. Procedimiento para la preparación de hialuronidasa, que comprende la etapa de utilizar el bacillus, según la reivindicación 1; particularmente, que comprende las siguientes etapas:
 someter el bacillus, según la reivindicación 1, a un cultivo en pendiente, cultivo de siembra, cultivo de fermentación, centrifugación, precipitación fraccionada con sulfato de amonio, ultrafiltración, para obtener una hialuronidasa;
 10 preferiblemente, que comprende además las siguientes etapas:
 (1) someter el bacillus, según la reivindicación 1, a cultivo en pendiente para obtener una cepa en pendiente;
 (2) inocular la cepa en pendiente en un medio de cultivo de siembra esterilizado, y cultivar en condiciones de 25°C – 40°C, 100-200 rpm durante 10 a 24 horas, para obtener una solución de siembra;
 (3) inocular la solución de siembra en un medio de cultivo de fermentación esterilizado, y cultivar en condiciones de 25°C –
 15 40°C, 100-300 rpm durante 12 a 24 horas, para obtener un caldo de fermentación de hialuronidasa;
 (4) separar el caldo de fermentación por centrifugación para obtener un sobrenadante;
 (5) someter el sobrenadante a precipitación fraccionada con sulfato de amonio, filtración (por ejemplo, filtración utilizando membrana de microfiltración de 0,65 µm), para obtener una hialuronidasa en bruto;
 (6) disolver la hialuronidasa en bruto precipitada en la etapa (5) en una solución de tampón de fosfato, eliminar las impurezas moleculares pequeñas por ultrafiltración, para obtener una hialuronidasa purificada.
 20 Opcionalmente, la etapa (6) puede llevarse a cabo mediante las etapas siguientes (6-1) a (6-3):
 (6-1): disolver la hialuronidasa en bruto de la etapa (5) en una solución tampón con pH 4,5-8,0 para obtener una solución de enzima en bruto; cargar la solución de enzima en bruto en una bolsa de diálisis con un corte molecular de $3,0 \times 10^3 - 1,4 \times 10^4$ Da, colocar en una solución tampón con un pH de 4,5-8,0, dializar a 4°C durante la noche;
 25 (6-2): someter la solución de enzima en bruto dializada a separación por cromatografía de intercambio iónico, en la que se utiliza un relleno de la columna de cromatografía de medio FF-gel de agarosa-DEAE y una solución de NaCl 0-0,5 M para la elución en gradiente, y recoger los picos de elución;
 (6-3): someter la muestra de hialuronidasa obtenida en la etapa (6-2) a una liofilización al vacío para obtener un polvo blanco como hialuronidasa.
 30
3. Hialuronidasa que se prepara mediante el procedimiento, según la reivindicación 2.
4. Polipéptido aislado, la secuencia de aminoácidos del cual se muestra en SEQ ID NO: 2; en particular, el polipéptido es hialuronidasa.
 35
5. Polinucleótido aislado que codifica la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2; en particular, el polinucleótido es la secuencia tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 o la secuencia complementaria de la SEQ ID NO: 3.
6. Vector recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5.
 40
7. Célula huésped recombinante que comprende el vector recombinante según la reivindicación 6.
8. Procedimiento para preparar ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico, que comprende la etapa de degradar el ácido hialurónico o sales del mismo con un peso molecular mayor que 10 kDa mediante la utilización de la hialuronidasa, según la reivindicación 3, o el polipéptido, según la reivindicación 4;
 45 preferiblemente, que comprende además las siguientes etapas:
 1) preparación de la solución de ácido hialurónico o sales del mismo: adición de ácido hialurónico o sales del mismo con un peso molecular mayor que 10 kDa a agua purificada para obtener una solución con una concentración de 1% p/v-30% p/v;
 50 2) enzimólisis: ajuste de la temperatura de la solución de la etapa 1) a 20°C-48°C, pH a 4-9, a continuación, adición de hialuronidasa de bacillus a la solución, degradación del ácido hialurónico o sales del mismo hasta un peso molecular deseado, para obtener una solución de enzimólisis;
 3) inactivación: mantenimiento de la solución de enzimólisis a 50°C-90°C durante 10-60 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus;
 55 preferiblemente, que comprende además las etapas siguientes:
 4) filtración: adición de una sal inorgánica soluble a la solución de enzimólisis inactivada, agitación hasta que esté completamente disuelta, a continuación, filtración con membrana de filtración de 0,45 µm para obtener un filtrado, en el que por cada 100 ml de solución de enzimólisis, se añaden 0,1-10 g de la sal inorgánica soluble;
 5) precipitación: mezclado uniforme del filtrado de la etapa 4) con alcohol o cetona en 3-20 veces el volumen del filtrado para precipitar el hialuronato oligomérico;
 60 6) deshidratación y secado: separación del precipitado de hialuronato oligomérico de la etapa 5), deshidratación con un

disolvente orgánico, a continuación, secado al vacío, para obtener el hialuronato oligomérico.

9. Procedimiento, según la reivindicación 8, que satisface uno o más de los siguientes A-H:

- 5 A. en la etapa 1), por cada 1 kg de ácido hialurónico o sales del mismo, se añaden 2×10^7 - 5×10^7 UI de hialuronidasa de bacillus;
- B. en la etapa 1) el hialuronato se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio y sal de zinc del ácido hialurónico;
- C. en la etapa 2), la temperatura para la enzimólisis es 35°C - 45°C , el pH para la enzimólisis es de 5,5 a 7,5, y el ácido hialurónico se enzimoliza para tener un peso molecular mayor que o igual a 3000 Da, y menor que 10^4 Da;
- 10 D. en la etapa 2) se utiliza un ácido o una base para ajustar el pH a 4-9, dicho ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, dicha base es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio;
- E. en la etapa 3), la solución de enzimólisis se mantiene a 55°C - 65°C durante 20-30 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus;
- 15 F. en la etapa 4), dicha sal inorgánica soluble se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de zinc y sal de magnesio; preferiblemente, es cloruro, sulfato o nitrato de sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio;
- E. en la etapa 5), dicho alcohol o cetona es etanol, acetona, metanol, propanol, o isopropanol;
- F. en la etapa 6), el disolvente orgánico usado para deshidratar es cetona o alcohol.

20 10. Procedimiento para la preparación de ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular, que comprende la etapa de degradar el ácido hialurónico con un peso molecular superior a 1000 kDa o sales del mismo utilizando la hialuronidasa, según la reivindicación 3, o el polipéptido, según la reivindicación 4, preferiblemente, que comprende además las siguientes etapas:

- 25 1) preparación de una solución de ácido hialurónico o sales del mismo: adición de ácido hialurónico o sales del mismo con un peso molecular mayor que 10 kDa a agua purificada para preparar una solución con una concentración de 0,1% p/v-2% p/v;
- 2) enzimólisis: ajuste de la temperatura de la solución de la etapa 1) a 20°C - 48°C , pH a 4-9, a continuación, adición de hialuronidasa de bacillus a la solución, degradación del ácido hialurónico o sales del mismo hasta un peso molecular deseado, para obtener una solución de enzimólisis;
- 30 3) inactivación: mantenimiento de la solución de enzimólisis a 50°C - 90°C durante 10-60 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus; preferiblemente, que comprende además las etapas siguientes:
- 4) filtración: adición de una sal inorgánica soluble al hidrolizado enzimático inactivado, agitación hasta que esté completamente disuelta, a continuación, filtración con membrana de filtración de $0,45 \mu\text{m}$ para obtener un filtrado, en el que por cada 100 ml de solución de enzimólisis, se añaden 0,1-10 g de la sal inorgánica soluble;
- 35 5) precipitación: mezclado uniforme del filtrado de la etapa 4) con alcohol o cetona en 1-10 veces el volumen del filtrado para precipitar el hialuronato de bajo peso molecular;
- 6) deshidratación y secado: separación del precipitado de hialuronato de bajo peso molecular de la etapa 5), deshidratación con un disolvente orgánico, a continuación, secado al vacío, para obtener el hialuronato de bajo peso molecular.

11. Procedimiento, según la reivindicación 10, que satisface uno o más de los siguientes A-H:

- 45 A. en la etapa 1), por cada 1 kg de ácido hialurónico o sales del mismo, se añaden 10^6 - 10^7 UI de hialuronidasa de bacillus;
- B. en la etapa 1) el hialuronato se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio y sal de zinc del ácido hialurónico;
- C. en la etapa 2), la temperatura para la enzimólisis es 35°C - 45°C , el pH para la enzimólisis es de 5,5 a 7,5, y el ácido hialurónico se enzimoliza hasta un peso molecular de 10 kDa-1000 kDa; en particular, el ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular se obtiene por el procedimiento de digestión enzimática;
- 50 D. en la etapa 2) se utiliza un ácido o una base para ajustar el pH a 4-9, dicho ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético glacial, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, dicha base es hidróxido de sodio o hidróxido de potasio;
- E. en la etapa 3), la solución de enzimólisis se mantiene a 55°C - 65°C durante 20-30 minutos para inactivar la hialuronidasa de bacillus;
- F. en la etapa 4), dicha sal inorgánica soluble se selecciona del grupo que consiste en sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de zinc y sal de magnesio; preferiblemente, es cloruro, sulfato o nitrato de sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio;
- E. en la etapa 5), dicho alcohol o cetona es etanol, acetona, metanol, propanol, o isopropanol;
- F. en la etapa 6), el disolvente orgánico usado para deshidratar es cetona o alcohol.

60 12. Composición que comprende la hialuronidasa, según la reivindicación 3, el péptido, según la reivindicación 4, el polinucleótido, según la reivindicación 5, el vector recombinante según la reivindicación 6, o la célula huésped

recombinante, según la reivindicación 7; opcionalmente, que comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable o bromatológicamente aceptable.

5 13. Uso del bacillus, según la reivindicación 1, o el polinucleótido, según la reivindicación 5, o el vector recombinante, según la reivindicación 6, o la célula huésped recombinante, según la reivindicación 7, en la fabricación de hialuronidasa.

10 14. Uso de la hialuronidasa, según la reivindicación 3, o el polipéptido, según la reivindicación 4, en la preparación de ácido hialurónico oligomérico o hialuronato oligomérico, ácido hialurónico de bajo peso molecular o hialuronato de bajo peso molecular, o sulfato de condroitina de bajo peso molecular.

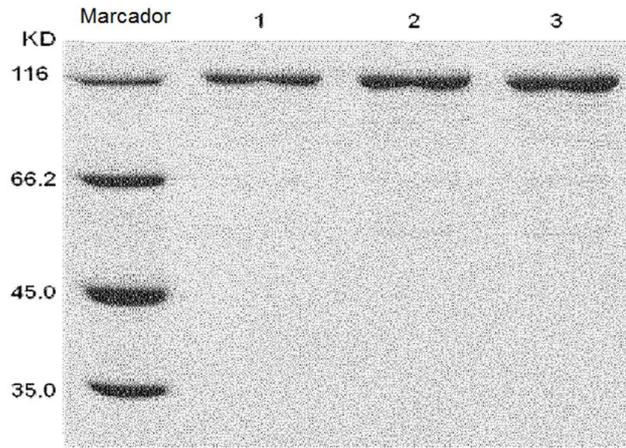


Figura 1

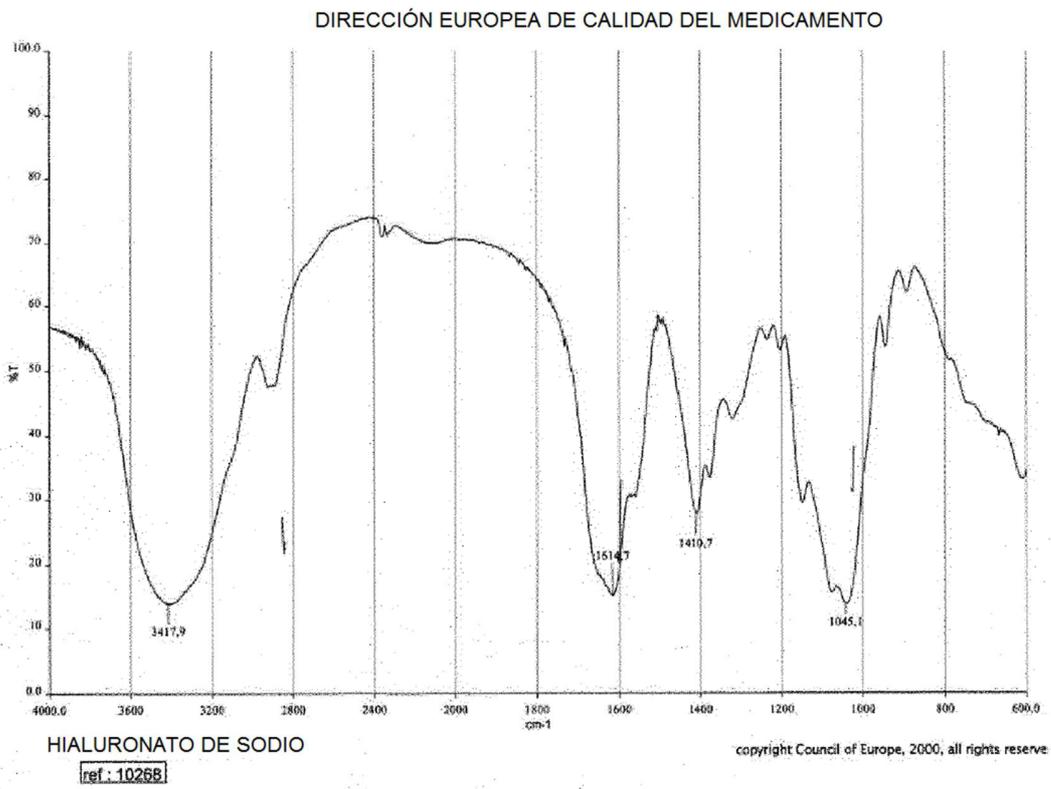


FIGURA 2(A)

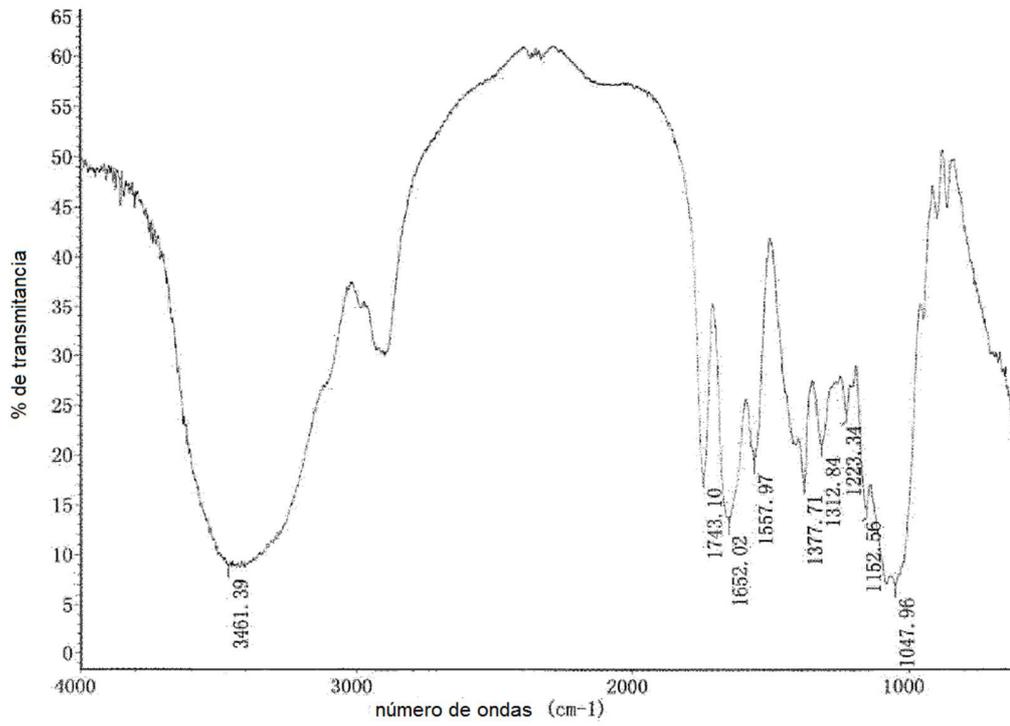


Figura 2(B)

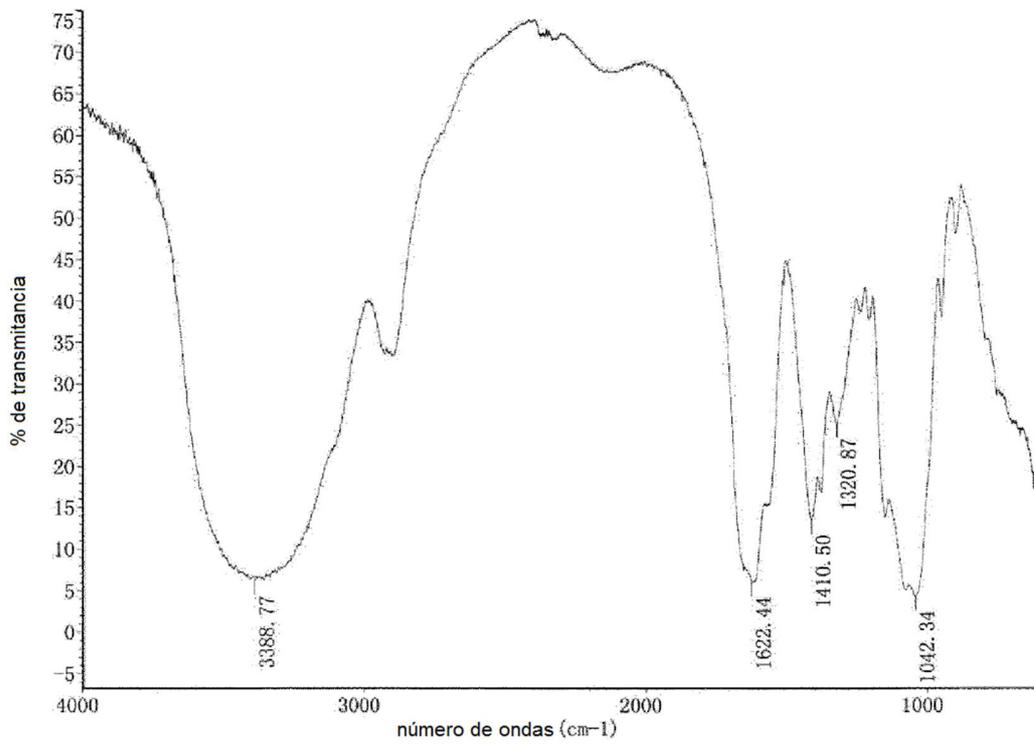


Figura 2(C)

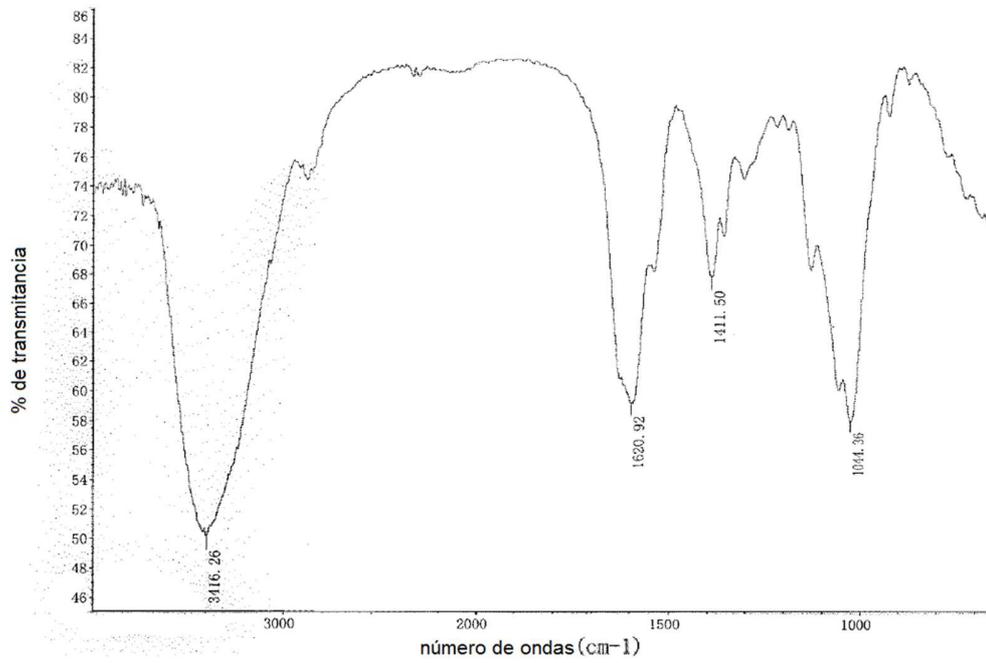


Figura 2(D)

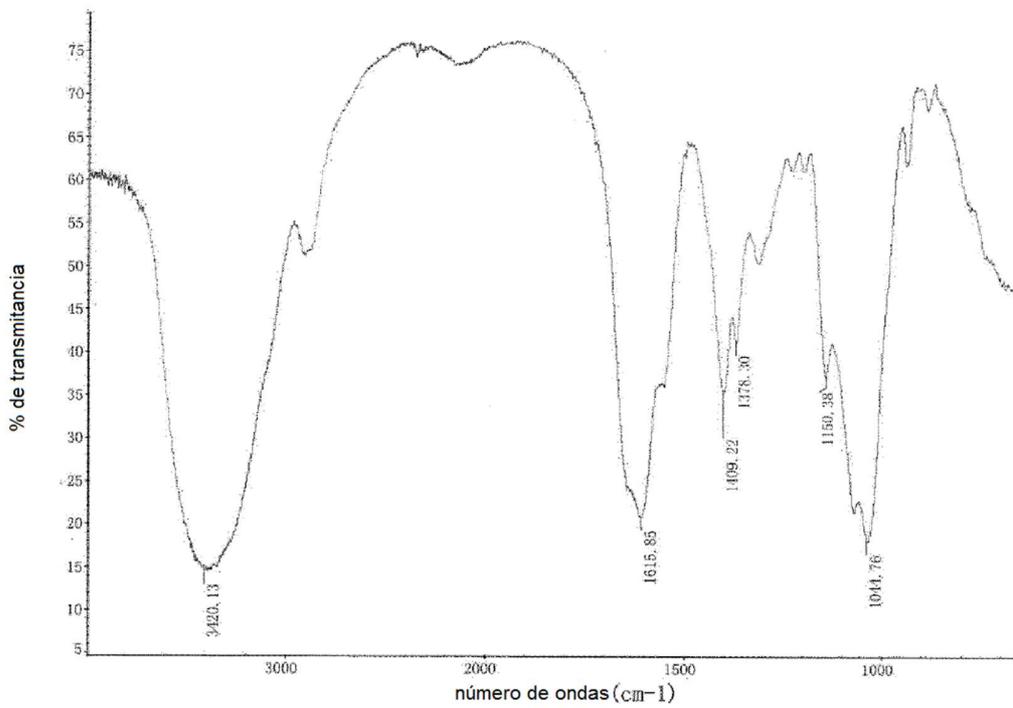


Figura 2(E)

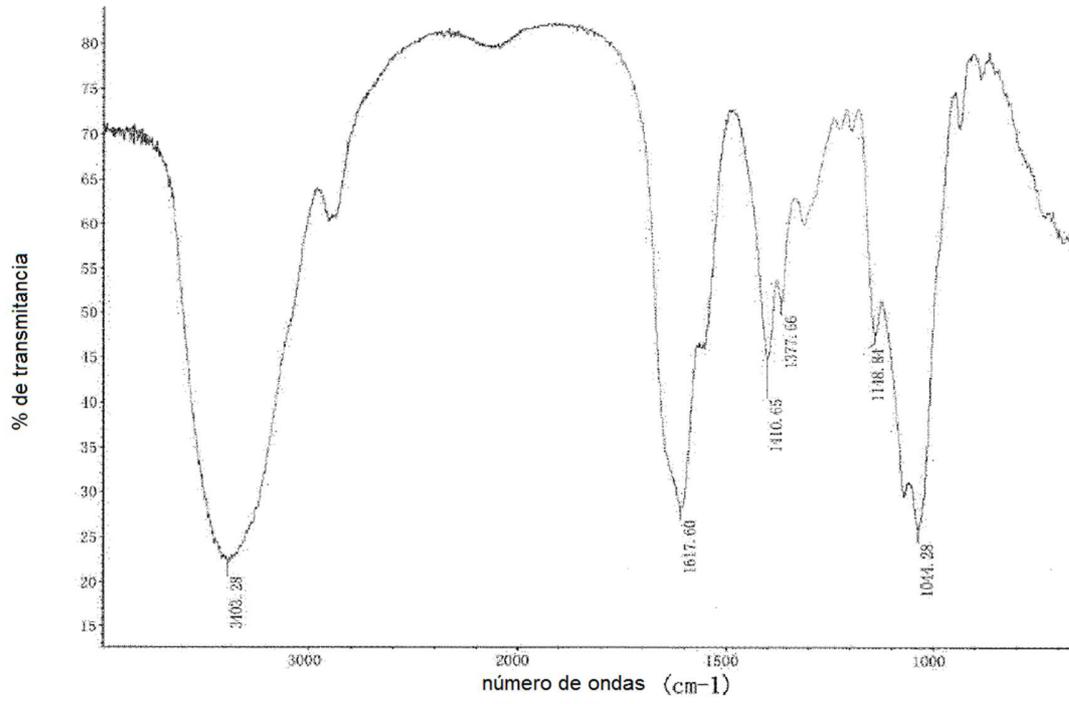


Figura 2(F)

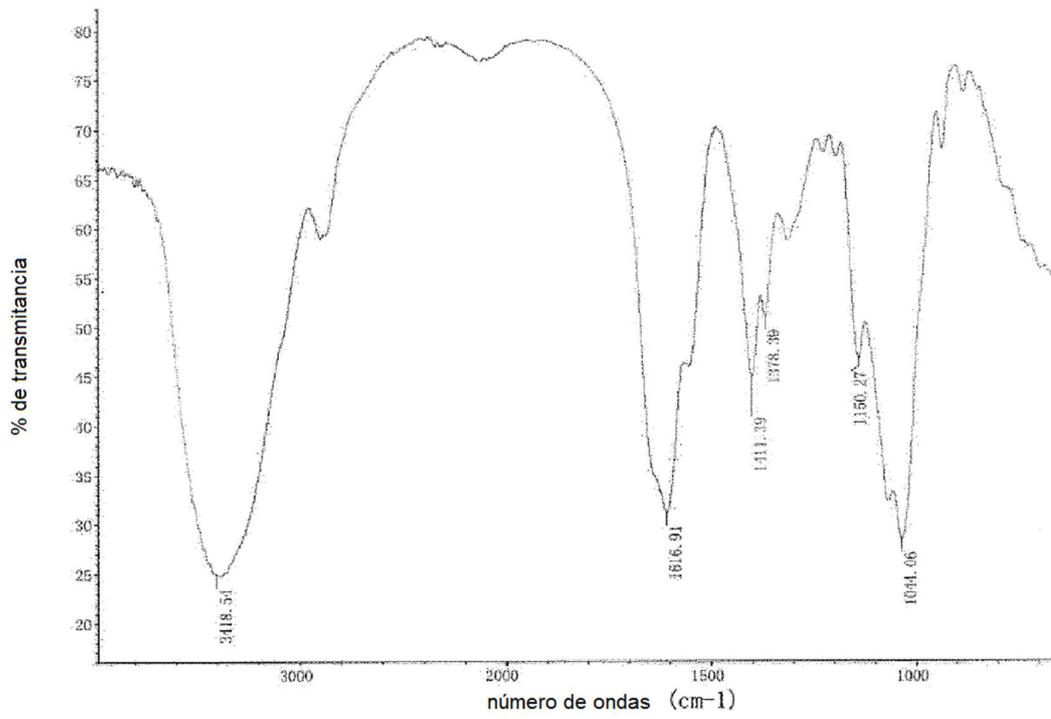


Figura 2(G)

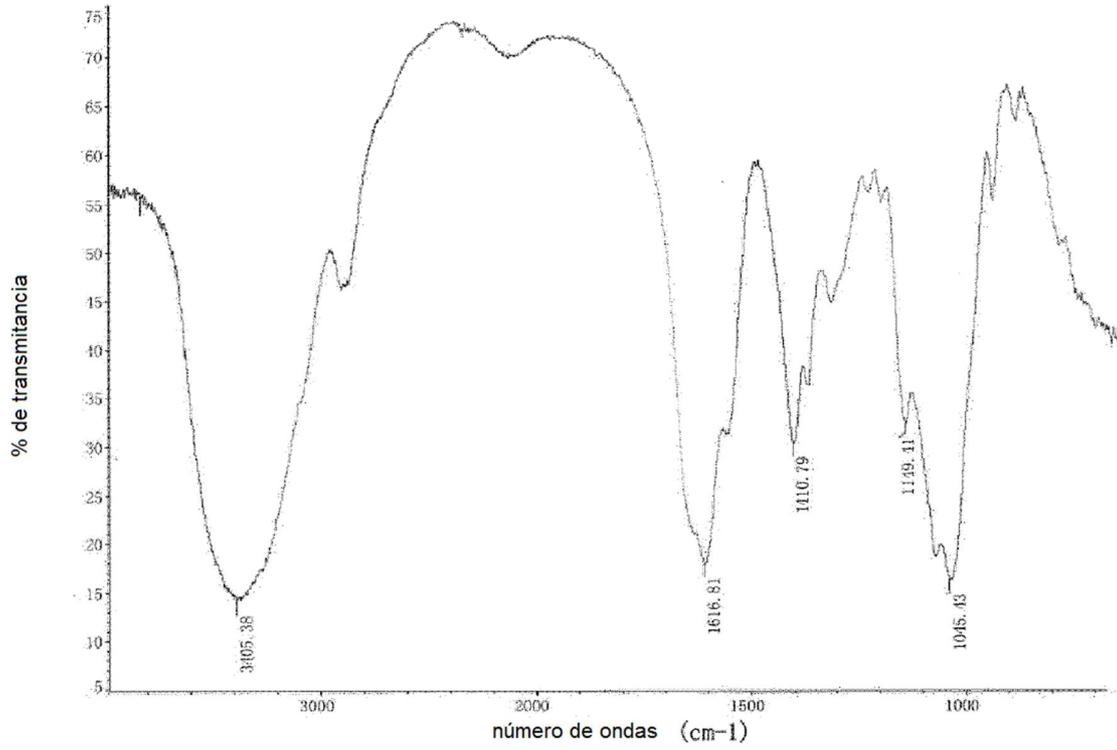


Figura 2(H)

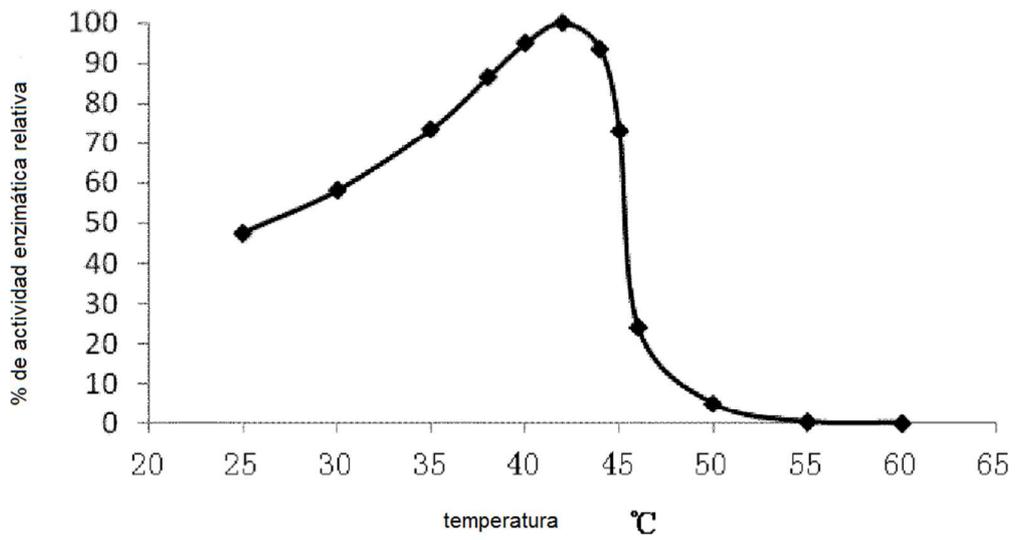


Figura 3(A)

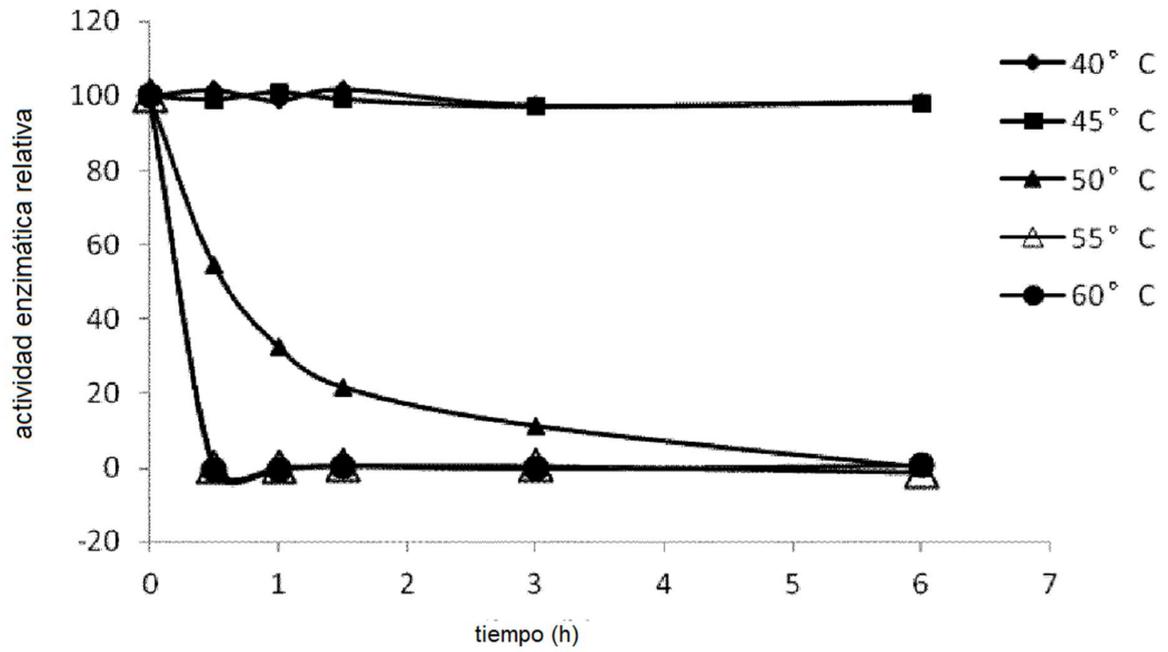


Figura 3(B)

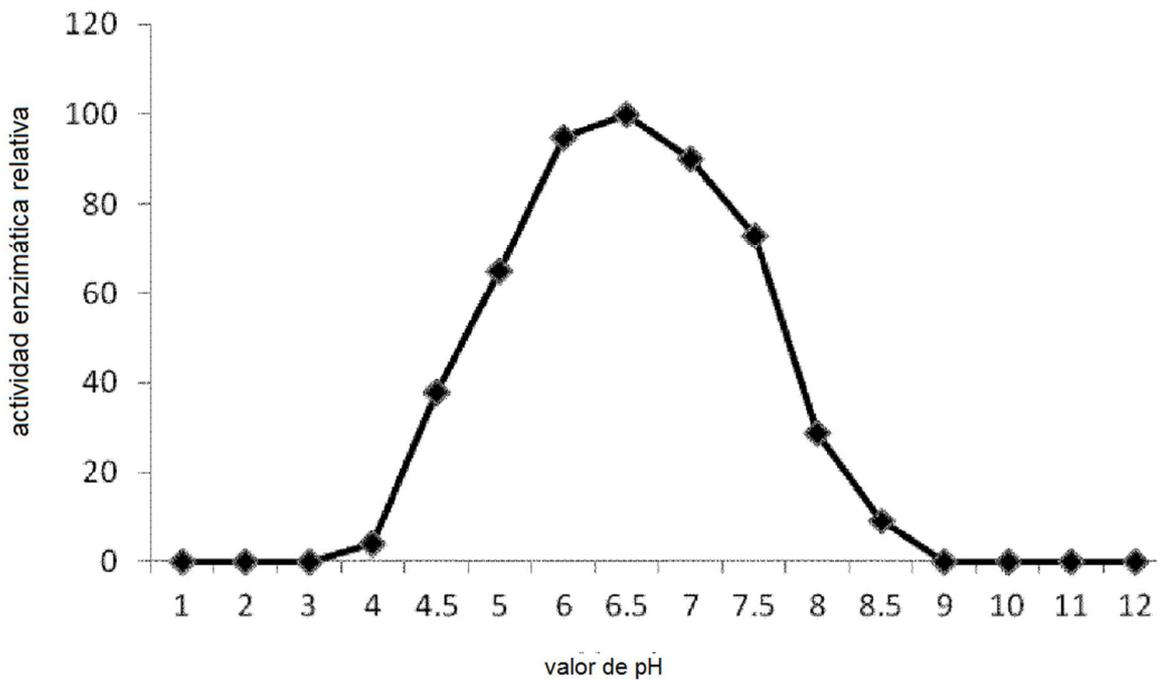


Figura 4(A)

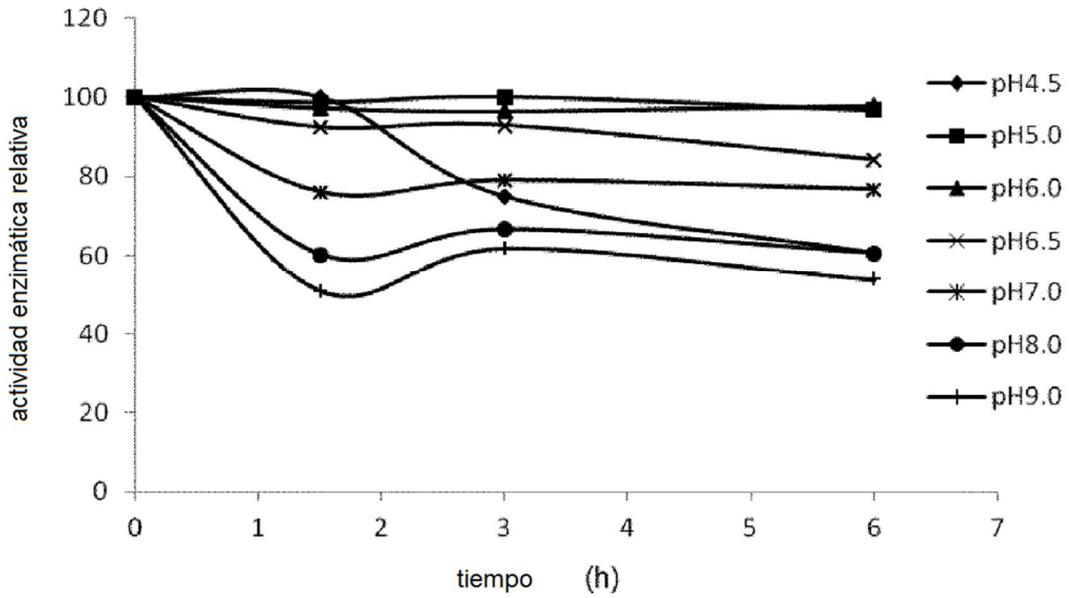


Figura 4(B)

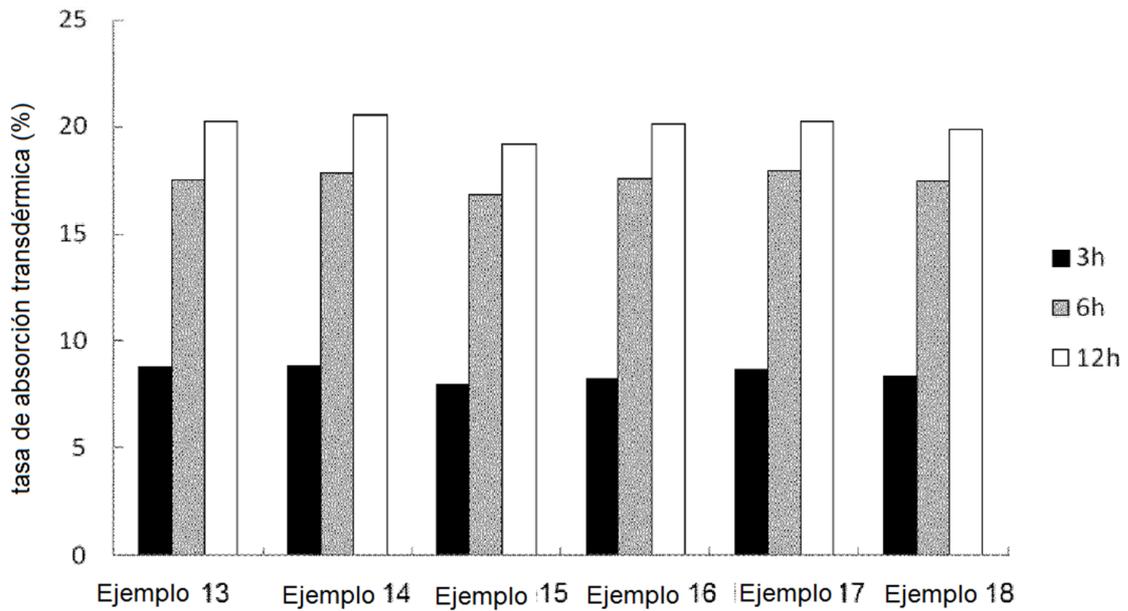


Figura 5(A)

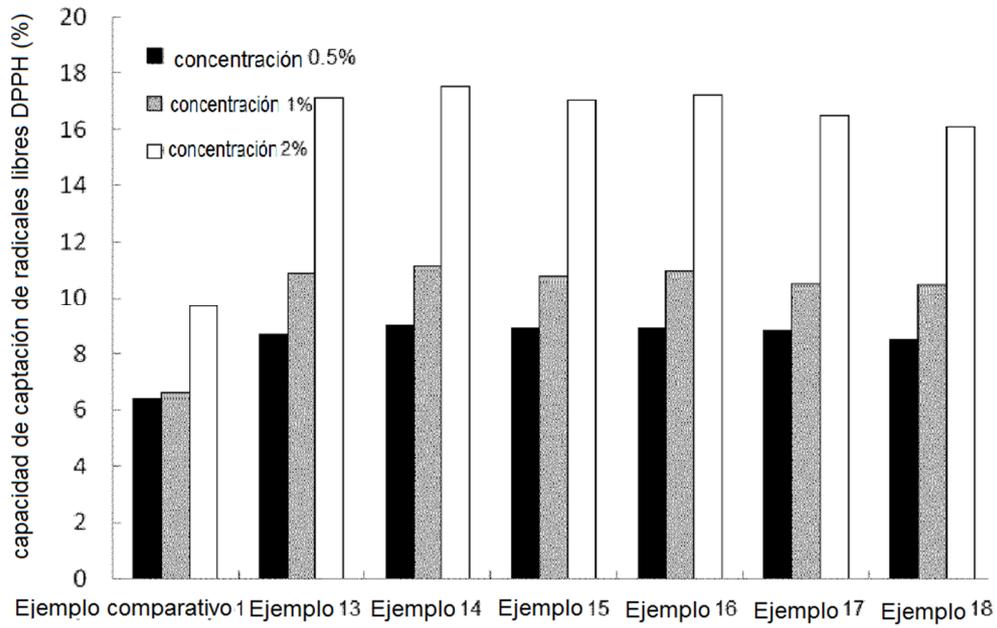


Figura 5(B)

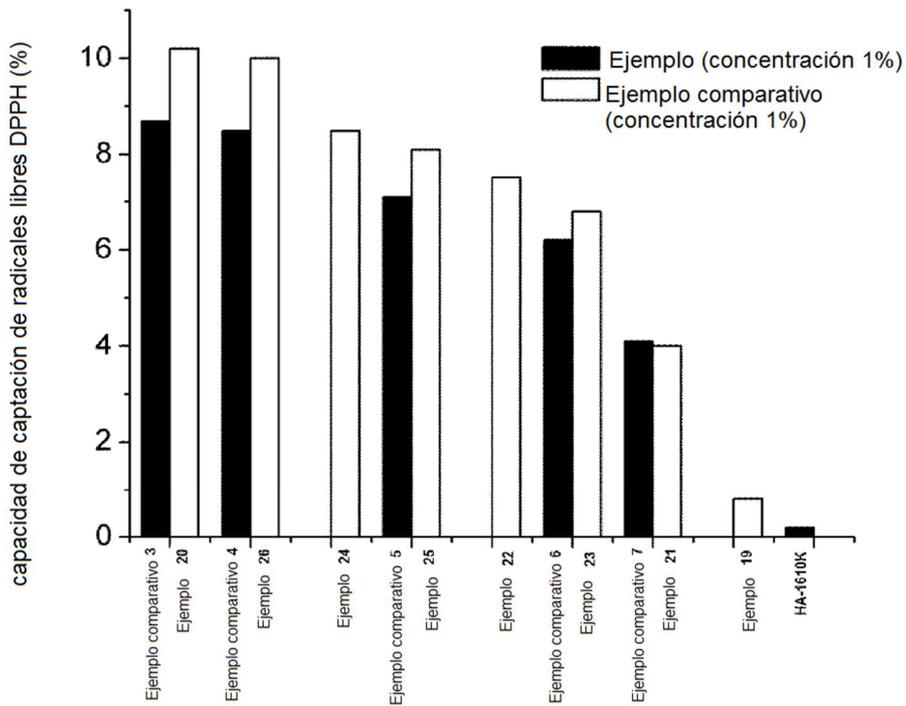


Fig.5(C)

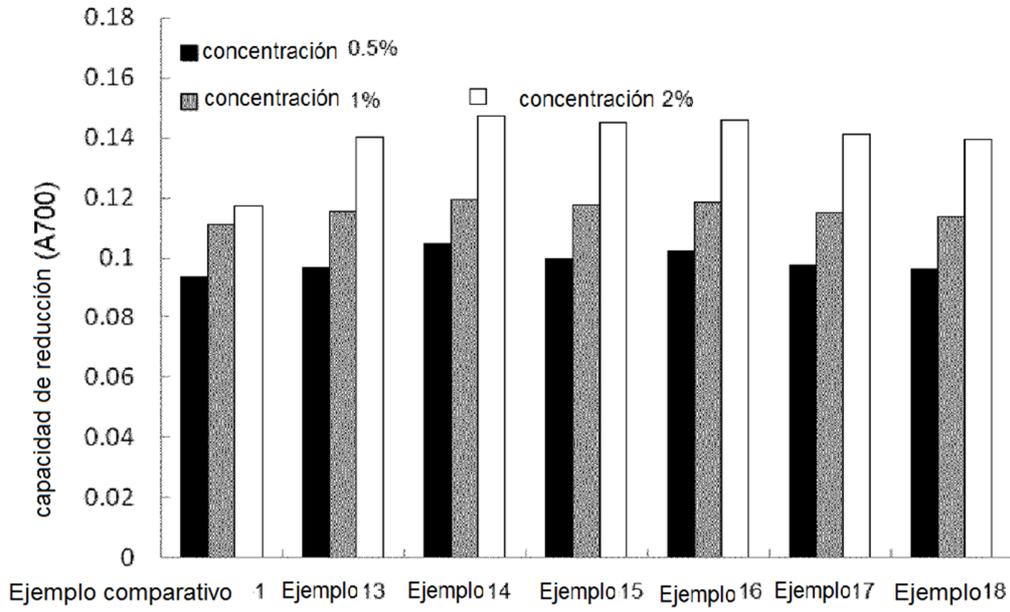


Figura 5(D)

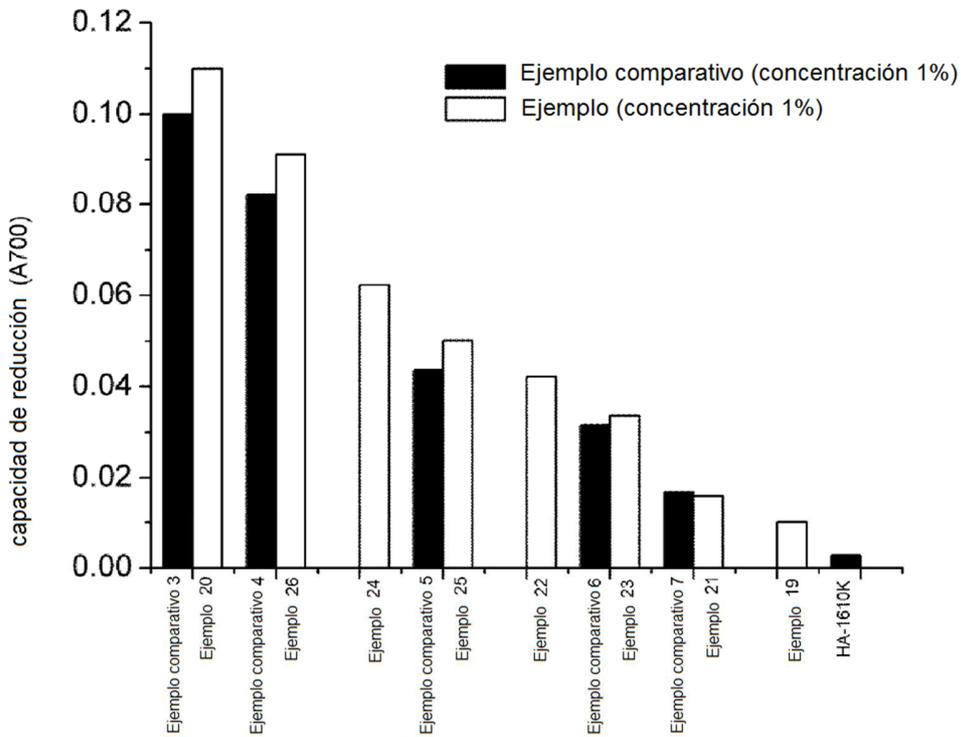


Figura 5(E)

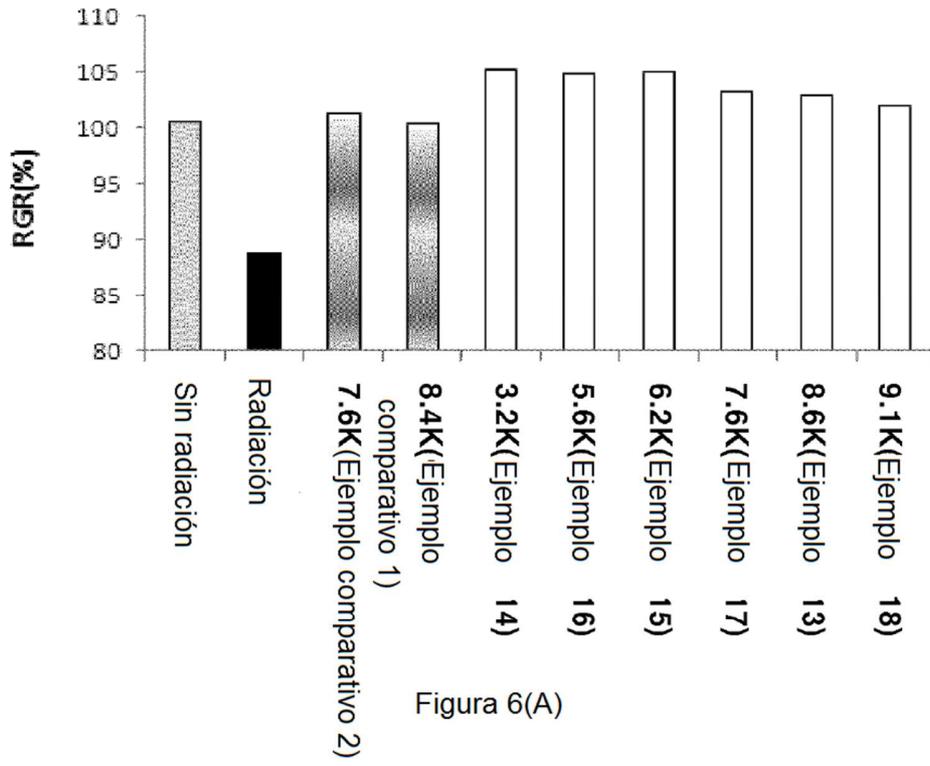


Figura 6(A)

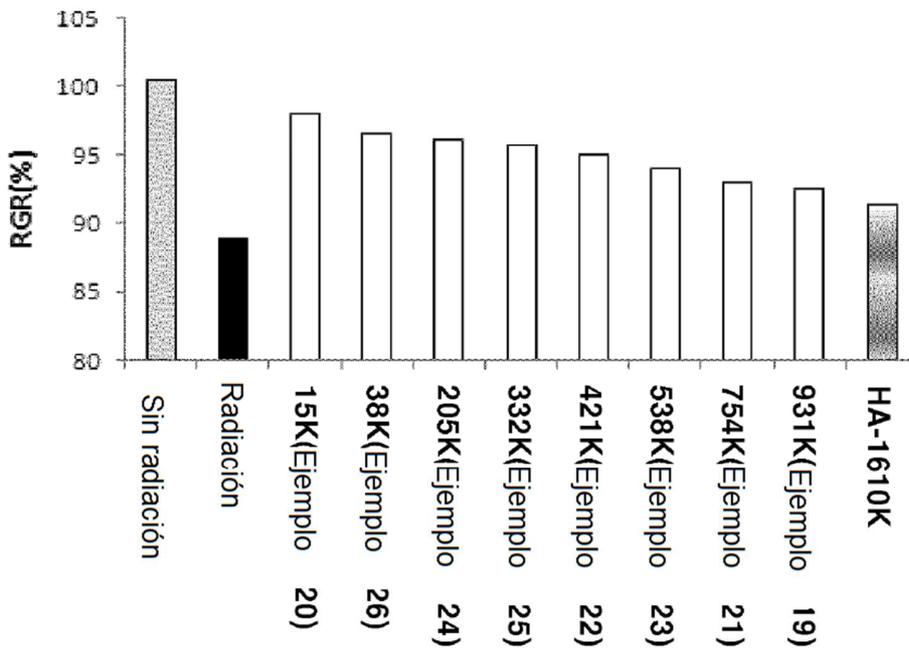


Figura 6(B)

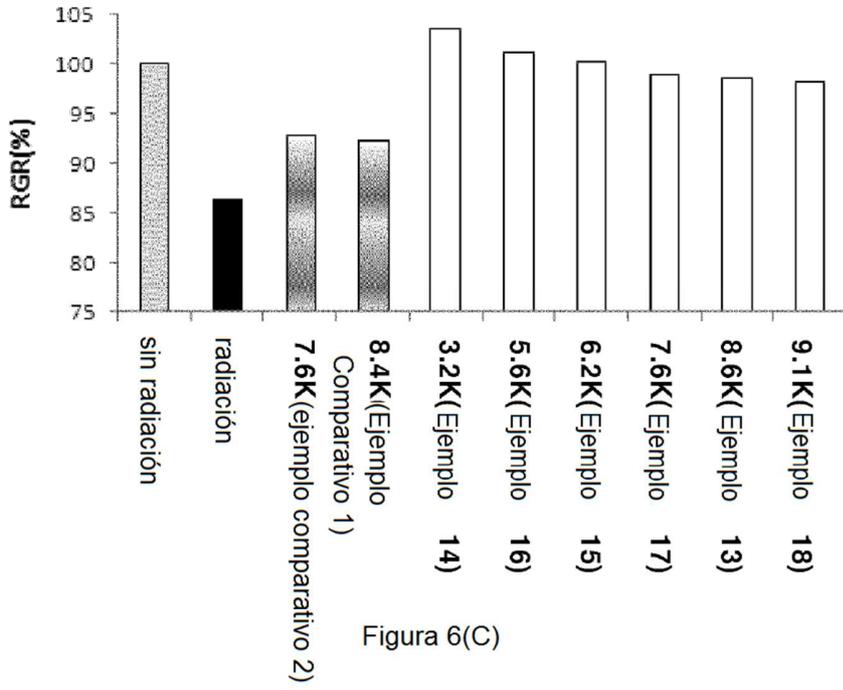


Figura 6(C)

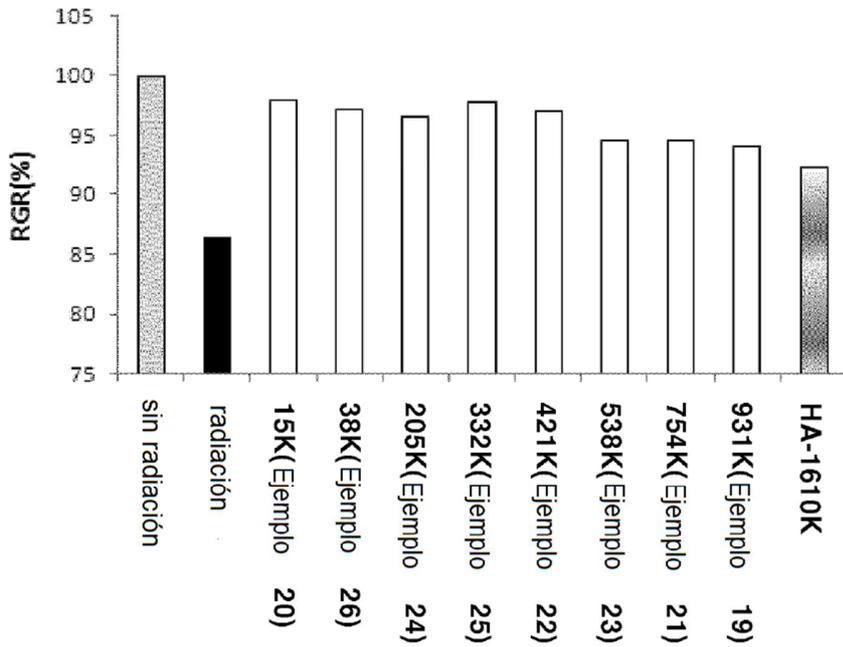


Figura 6(D)