

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-2694**
(22) Přihlášeno: **27.01.2000**
(30) Právo přednosti: **28.01.1999 CH 154/99**
(40) Zveřejněno: **13.02.2002**
(**Věstník č. 2/2002**)
(47) Uděleno: **26.11.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **06.01.2010**
(**Věstník č. 1/2010**)
(86) PCT číslo: **PCT/IB2000/000082**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/044925**

(11) Číslo dokumentu:

301 306

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12P 19/26 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
EP 0694616; US 4517295; EP 1144668.

(73) Majitel patentu:
TRB CHEMEDICA SA, Vouvry, CH

(72) Původce:
Carlino Stefano, Monthey, CH
Magnette François, Marsens, CH

(74) Zástupce:
JUDr. Jan Matějka, Národní 32, Praha, 11000

(54) Název vynálezu:
**Způsob čištění kyseliny hyaluronové o vysoké
molekulové hmotnosti**

(57) Anotace:
Způsob čištění kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje, který zahrnuje stupeň úpravy pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje na hodnotu v rozmezí od 1,7 do 3,3 s následnou diafiltrací uvedeného vodného roztoku při uvedené hodnotě pH přes filtr o velikosti pórů v rozmezí od limitu separace nominální molekulové hmotnosti 100 000 Daltonů do 0,45 µm, stupeň odstranění buněk z vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje a stupeň sterilizace.

CZ 301306 B6

Způsob čištění kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnostiOblast techniky

5 Vynález se týká způsobu čištění kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnosti nebo její soli.

Dosavadní stav techniky

10 Kyselina hyaluronová je mukopolysacharid biologického původu v přírodě značně rozšířený. Je například známo, že kyselina hyaluronová je obsažena v živočišných tkáních jako v pupeční šňůře, synoviální tekutině, ve sklivci, v kohoutím hřebenu a v různých pojivových tkáních jako v kůži a v chrupavce.

15 Chemicky patří kyselina hyaluronová mezi glykosaminoglykany a obsahuje střídající se a opakující se jednotky D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu tvořící lineární řetězec o molekulové hmotnosti až do 13×10^6 Daltonů.

20 Výraz „kyselina hyaluronová o vysoké molekulové hmotnosti“ používaný v přihlášce tohoto vynálezu znamená kyselinu hyaluronovou o molekulové hmotnosti, jejíž hodnota není menší než asi $0,5 \times 10^6$ Daltonů.

Je zapotřebí upozornit na skutečnost, že výraz „kyselina hyaluronová“ uváděný v popisu vynálezu i v patentových nárocích může znamenat bez rozlišování jak kyselinu hyaluronovou ve své kyselé formě, nebo může znamenat její sůl například natriumhyaluronát, kaliumhyaluronát, magnesiumhyaluronát, kalciumhyaluronát nebo další.

25 Kyselina hyaluronová o vysoké molekulové hmotnosti je viskózní a je schopná si zachovávat gelovitý stav, má lubrikační účinky a zabraňuje invazi bakterií a zadržuje vodu.

Díky těmto vlastnostem kyselina hyaluronová umožňuje zachovávat tonicitu a elasticitu kůže.

V literatuře existují obsáhlé údaje o farmaceutickém použití kyseliny hyaluronové nebo její soli.

30 Protože kyselina hyaluronová je neimunogenní sloučenina a má viskózně-elastické a hydrofilní vlastnosti, používá se již několik let jako náhrada sklivce nebo kloubního mazu nebo jako nosné médium v oční chirurgii jak je popsáno například v US-A 4 141 973, Balazs.

V kloubních mazech působí roztok kyseliny hyaluronové jako kluzný prostředek poskytující buňkám ochranné prostředí, a proto se používá pro léčbu zánětu kolenních kloubů.

35 V EP-A 0 781 547, Chemedica S. A, je popsán oftalmický přípravek obsahující natriumhyaluronát pro použití v oční chirurgii.

V EP-A 0 719 559, Chemedica S. A, jsou popsány viskózní roztoky natriumhyaluronátu vhodné jako maskovací tekutiny při terapeutické fotokeratektomií pomocí „excimer-laseru“.

40 V EP-A 0 875 248, Chemedica S. A, je popsáno použití kyseliny hyaluronové nebo některé z jejích farmaceuticky přijatelných solí pro přípravu vodných roztoků vhodných jako tekutiny pro intraartikulární výplachy.

V EP-A 0 698 388, Chemedica S. A, je popsán oftalmický přípravek sloužící jako náhrada slz, který obsahuje hyaluronát jako prostředek pro zvýšení viskozity.

45 Díky své vysoce hydrofilní podstatě, je možné kyselinu hyaluronovou použít také v kosmetických produktech jako v pleťových vodách a krémech.

Pro farmaceutické použití kyseliny hyaluronové nebo její soli se vyžaduje, aby uvedené složky byly ve vysoce čisté formě.

- 5 Kyselinu hyaluronovou lze extrahovat a získat přečištěním například z pupeční šňůry, z kohoutích hřebínků nebo ze streptokoků skupiny A a C jak je popsáno například v US-A 4 141 973, Balasz a v US-A 5 559 104, Romeo a sp.

- 10 Přípravu kyseliny hyaluronové s použitím streptokoků poprvé popsali Forres a sp., v roce 1937 (J. Biol. Chem., 118, 61 (1937)) a později bylo prokázáno, že kyselina hyaluronová získaná ze zvířecích zdrojů je totožná s kyselinou hyaluronovou získanou z mikrobiologických zdrojů.

Způsoby přípravy kyseliny hyaluronové z mikrobiologických zdrojů jsou založené na vlastnosti streptokoků, že jejich buněčná stěna obsahuje jako hlavní složku kyselinu hyaluronovou.

- 15 Uvedené mikroorganismy jsou schopné transformovat glukosu obsaženou v jejich životním prostředí na D-glukuronovou kyselinu a N-acetyl-G-glukosamin a jako sekundární metabolit produkovat kyselinu hyaluronovou pro tvorbu své ochranné stěny.

Biosyntéza kyseliny hyaluronové je popsána například v US-A 4 897 349, Swann a sp.

- 20 Pro získávání kyseliny hyaluronové nebo její soli z mikrobiologických zdrojů ve farmaceutické čistotě je známých více způsobů.

- 25 Například v US-A 4 780 414, Nimrod a sp., US-A 4 517 295, Bracke a sp., a v US-A 5 563 051, Ellwood a sp., jsou uvedené způsoby získávání kyseliny hyaluronové kontinuální fermentací bakterií rodu *Streptococcus* s následným přečištěním až na farmaceutickou čistotu.

Nicméně ve všech uvedených procesech způsoby čištění kyseliny hyaluronové zahrnují vysrážení kyseliny hyaluronové z mikrobiologického prostředí s použitím velkých množství organických rozpouštědel jako je ethanol, aceton, isopropanol atd.

- 30 Jsou také známy některé způsoby čištění kyseliny hyaluronové z mikrobiologických zdrojů s použitím kvarterních amoniových solí (US-A 4 517 295, Bracke a sp.) nebo s použitím aniontových nebo kationtových povrchově aktivních prostředků (US-A 5 316 926, Brown a sp.).

Nicméně výše popsané způsoby jsou vcelku složité, což vede k vysoké ceně produktů.

- 35 Jsou také známy způsoby čištění, kde roztok kyseliny hyaluronové se zpracuje diafiltrací s použitím filtru s nominální hodnotou separace molekulové hmotnosti 10 000, 20 000 nebo 30 000 Daltonů, popsáno například v US-A 5 563 051, Ellwood a sp., a v US-A 4 517 295, Bracke a sp.

- 40 Nicméně, vzhledem k nízké hodnotě separačního limitu molekulové hmotnosti lze výše uvedené diafiltrační způsoby použít pouze k odstranění velmi malých molekul a diafiltrovaný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou musí být dále zpracován způsoby zahrnujícími různé způsoby srážení, což vede k tomu, že uvedené způsoby zůstávají i nadále složité.

- 45 Cílem předloženého vynálezu je poskytnout způsob získávání kyseliny hyaluronové nebo její soli o vysoké molekulové hmotnosti mající farmaceuticky přijatelnou čistotu z biologických zdrojů, zvláště z mikrobiologických zdrojů, ve vysokém výtěžku, při poměrně nízkých nákladech a výhodně bez použití organických rozpouštědel nebo bez přídavku dalších prostředků.

Podstata vynálezu

- 50 Výše uvedený cíl lze podle vynálezu docílit způsobem čištění kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnosti z biologického zdroje charakterizovaným tím že zahrnuje následující stupně:

a) stupeň úpravy pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje na pH v rozmezí 1,7 až 3,3 s následnou diafiltrací uvedeného roztoku při stejné hodnotě pH s použitím filtru o velikosti pórů s nominálním separačním limitem molekulové hmotnosti od 100 000 Daltonů do 0,45 μm ;

5 b) stupeň odstranění buněk z vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje, kde uvedený stupeň se provede před stupněm (a) nebo po stupni (a);

c) stupeň sterilizace.

10 Výše uvedeným způsobem zahrnujícím stupeň diafiltrace při pH v rozmezí od 1,7 do 3,3 a stupeň odstranění buněk lze tak výhodně přechistit kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti z biologického zdroje a zejména z mikrobiologického zdroje a získat tak kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti nebo její sůl ve farmaceuticky přijatelné čistotě a ve vysokém výtěžku.

15 Ve stupni (a) způsobu podle vynálezu se kyselina hyaluronová zpracuje diafiltrací s použitím filtru nominálního limitu separace molekulové hmotnosti nebo velikosti pórů umožňujícího recirkulaci kyseliny hyaluronové a průchod všech ostatních složek obsažených v roztoku nebo v půdě filtrem.

20 Způsob podle vynálezu lze provést s použitím jakéhokoliv biologického zdroje kyseliny hyaluronové.

Způsobem podle vynálezu lze kyselinu hyaluronovou ve farmaceuticky přijatelné čistotě výhodně připravit bez stopových průvodních množství organických rozpouštědel nebo dalších přidávaných složek, protože způsob čištění podle vynálezu nezahrnuje srážení organickými rozpouštědly nebo dalšími prostředky, nýbrž kyselina hyaluronová zůstává v celém průběhu uvedeného způsobu udržovaná v roztoku.

Další cíle, vlastnosti a výhody vynálezu budou zřejmé z následujícího podrobného popisu.

Způsobem podle vynálezu je možné přechistit kyselinu hyaluronovou z jakéhokoliv biologického zdroje až na farmaceuticky přijatelnou čistotu.

30 Například vodný roztok kyseliny hyaluronové obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti určený k prvotnímu zpracování buď ve stupni (a) podle vynálezu nebo ve stupni (b) podle vynálezu může být vodný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou získaný extrakcí pupeční šňůry, kohoutích hřebínků nebo jiných zdrojů.

35 Nicméně ve výhodném provedení podle vynálezu je vodný roztok kyseliny hyaluronové obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti určený nejprve ke zpracování buď ve stupni (a) podle vynálezu, nebo ve stupni (b) podle vynálezu vodná půda obsahující kyselinu hyaluronovou z mikrobiologického zdroje.

40 Mikrobiologický zdroj je výhodně mikroorganismus rodu *Streptococcus* produkující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti, a ještě výhodněji se mikrobiologický zdroj zvolí ze skupiny zahrnující *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* a *Streptococcus pyogenes*.

45 Půdy obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti lze připravit kterýmikoliv způsoby v oboru dobře známými, zahrnujícími fermentaci kultury *Streptococcus* ve vhodném vodném médiu a za vhodných podmínek za tvorby kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnosti. Uvedené způsoby jsou popsány například v US-A 4 780 414, Nimrod a sp., US-A 5 563 051, Ellwood a sp., nebo v US-A 5 316 916, Brown a sp.

50 Způsob přípravy vodné půdy obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti podle vynálezu lze provést například následovně:

Na konci obvykle používaného fermentačního způsobu se půda mající pH asi 7,4 obsahující kyselinu hyaluronovou převede do nádrže opatřené systémem pro automatické řízení teploty.

Teplota se pak udržuje na hodnotě v rozmezí od 15 do 25 °C, výhodně na 20 °C.

- 5 Vodný roztok kyseliny hyaluronové nebo půda obsahující kyselinu hyaluronovou se pak zpracuje způsobem čištění podle vynálezu.

- 10 Odstranění veškerých proteinů a dalších rozpustných složek obsažených ve vodném roztoku se pak provede ve stupni (a) diafiltraci roztoku získaného z biologického zdroje o pH v rozmezí od 1,7 do 3,3 s použitím filtru o velikosti pórů v rozmezí od separačního limitu nominální molekulové hmotnosti 100 000 Daltonů do 0,45 μm.

- 15 Předpokládá se, že když se pH roztoku kyseliny hyaluronové upraví na hodnotu v rozmezí od 1,7 do 3,3, dojde ke vzniku určitého typu zesítnění, kde molekuly kyseliny hyaluronové vytvoří síť, která se za podmínek jiných hodnot pH rozpadne.

- 20 V rozmezí hodnot pH od 1,7 do 3,3 tato síť neprochází filtrem o velikosti pórů v rozmezí velikosti od separačního limitu nominální molekulové hmotnosti 100 000 Daltonů do 0,45 μm, zatímco ostatní složky procházejí filtrem, což umožňuje separaci kyseliny hyaluronové od veškerých rozpuštěných složek obsažených v roztoku.

Ve stupni (a) se pH vodného roztoku výhodně upraví na hodnotu v rozmezí od 2,0 do 2,7 a pak se provede diafiltrace při uvedené hodnotě pH.

- 25 Ještě výhodněji se ve stupni (a) pH vodného roztoku upraví na hodnotu v rozmezí od 2,3 do 2,7 a pak se provede diafiltrace při uvedené hodnotě pH.

Ve stupni (a) se pH výhodně upraví pomocí vodného roztoku HCl.

- 30 V prvním výhodném provedení podle vynálezu, se stupeň (b) zahrnující odstranění buněk provede až po stupni (a) zahrnujícím diafiltraci, kde pH vodného roztoku nebo půdy obsahující kyselinu hyaluronovou z biologického zdroje se nejprve upraví na hodnotu v rozmezí od 1,7 do 3,3, výhodně na hodnotu v rozmezí od 2,5 do 2,6, výhodně vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové.

- 35 Při uvedených hodnotách pH, se vodný roztok nebo půda obsahující kyselinu hyaluronovou převede na viskozně-elastický vodný roztok nebo půdu obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti v zesítněném stavu.

- 40 Takto připravený vodný roztok nebo půda obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti se pak podrobí diafiltraci, výhodně diafiltraci s příčným rozvodem toku, za udržování hodnoty pH na konstantní hodnotě během celého diafiltračního stupně.

Zvláště výhodné je, když filtr použitý ve stupni (a) rafinačního způsobu podle prvního výhodného provedení vynálezu má velikost pórů 0,2 μm.

- 45 V uvedeném stupni (a) zahrnujícím diafiltraci, se viskozně-elastický vodný roztok nebo půda obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti čerpá do filtrační komory s příčným rozvodem toku opatřené vhodným počtem filtračních vložek o velikosti pórů v rozmezí od separačního limitu nominální molekulové hmotnosti 100 000 Daltonů do 0,45 μm, výhodně velikosti pórů 0,2 μm za přívodu apyrogenní destilované vody do zásobníku obsahujícího viskozně-elastický roztok obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti stejnou rychlostí jakou se odvádí filtrát aby byl zachován konstantní objem.
- 50

5 Ve stupni (a) rafinačního procesu podle prvního výhodného provedení vynálezu se viskozně-elastický roztok nebo půda obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti výhodně diafiltruje tak dlouho, dokud odstraňovaný filtrát nemá absorpenci (optickou hustotu, OD) při vlnové délce 280 nm rovnou nebo nižší než 0,02. V tomto případě by absorpance filtrátu při uvedené vlnové délce měla být sledovaná během celého diafiltračního procesu.

10 Podle uvedeného prvního výhodného provedení vynálezu, po stupni (a) zahrnujícím diafiltraci následuje stupeň (b), zahrnující odstranění buněk, výhodně stupeň (b) který zahrnuje odstředování k odstranění veškerých buněk nebo proteinů obsažených v diafiltrovaném roztoku nebo půdě.

10 V případě mikrobiologického zdroje může stupeň odstředování zahrnovat například úpravu pH diafiltrované půdy na pH na rozmezí od 3,5 do 5,0, výhodně na 4,0 a potom odstředění diafiltrované vodné půdy za získání supernatantu obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti.

15 Výhodně se hodnota pH diafiltrované půdy upraví pomocí vodného roztoku NaOH. Nicméně je možné použít i jiné alkalické roztoky.

Podle uvedeného prvního výhodného provedení, po stupni (b) zahrnujícím odstranění buněk se provede sterilizační stupeň (c).

20 Podle druhého výhodného provedení způsobu podle vynálezu se stupeň (b) zahrnující odstranění buněk provede před stupněm diafiltrace (a).

V uvedeném druhém výhodném provedení se stupeň (b) odstranění buněk výhodně provede v diafiltračním stupni s příčným rozvodem toku.

25 V uvedeném diafiltračním stupni odstraňování buněk (b) se pH vodného roztoku kyseliny hyaluronové nebo půdy získané z biologického zdroje nejprve upraví na 3,5 výhodně vodným roztokem HCl, a potom se získaný vodný roztok nebo půda diafiltruje při uvedeném pH s použitím filtru o velikosti 0,2 μm .

30 V uvedeném diafiltračním stupni (b) odstraňování buněk se vodný roztok nebo půda obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti čerpá do filtrační komory s příčným rozvodem toku opatřené vhodným počtem filtračních vložek o velikosti pórů 0,2 μm za přívodu sterilní apyrogenní destilované vody do zásobníku obsahujícího vodný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti stejnou rychlostí jakou se odvádí filtrát aby byl zachován konstantní objem.

35 Při uvedené hodnotě pH umožňuje filtr o velikosti pórů 0,2 μm recirkulaci buněk a průchod kyseliny hyaluronové filtrem.

40 Ve stupni (b) rafinačního způsobu podle druhého výhodného provedení se vodný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou výhodně o vysoké molekulové hmotnosti diafiltruje až do dosažení přídatku 10 ekvivalentních objemů apyrogenní destilované vody.

45 Ve stupni (a) uvedeného druhého výhodného provedení se pH vodného roztoku kyseliny hyaluronové v podstatě prosté buněk získané ve stupni (b) nejprve upraví na 1,7 až 3,3, výhodně na 2,4, výhodně pomocí vodného roztoku HCl.

Při uvedené hodnotě pH se vodný roztok kyseliny hyaluronové převede na velmi viskozně-elastický roztok obsahující kyselinu hyaluronovou v zesítěném uspořádání.

50 Takto získaný vodný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti se pak diafiltruje, výhodně v procesu s příčným uspořádáním toků, přičemž hodnota pH se udržuje na konstantní výše uvedené hodnotě během celého průběhu diafiltrace.

Ve stupni (a) uvedeného rafinačního způsobu podle vynálezu podle druhého výhodného provedení, se použije filtr se separačním limitem nominální molekulové hmotnosti 300 000 Daltonů.

- 5 V uvedeném diafiltračním stupni (a) se viskozně-elastický vodný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti čerpá do filtrační komory opatřené vhodným počtem filtračních vložek o velikosti pórů v rozmezí od separačního limitu nominální molekulové hmotnosti 100 000 Daltonů do 0,45 μm , výhodně s nominálním separačním limitem molekulové hmotnosti 300 000 Daltonů, za zahuštění a přívodu apyrogenní sterilní destilované vody do zá-
- 10 sobníku obsahujícího viskozně-elastický roztok obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti stejnou rychlostí jakou se odvádí filtrát aby byl zachován konstantní objem.

Ve stupni (a) rafinačního způsobu podle druhého výhodného provedení vynálezu se viskozně-elastický vodný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti výhodně diafiltruje až do dosažení přídatku 15 ekvivalentních objemů apyrogenní sterilní destilované vody. Filtrát se pak odstraní.

15

Při použití druhého výhodného provedení vynálezu je výhodné, že je vynecháno odstředování.

Podle uvedeného druhého provedení za stupněm (a) zahrnujícím diafiltraci následuje stupeň (c) zahrnující sterilizaci.

- 20 Sterilizační stupeň ve způsobu podle vynálezu se výhodně provede sterilizační filtrací.

Podle vynálezu je možné sterilizaci filtrací provést standardním způsobem sterilizace filtrací.

Podle uvedeného prvního provedení se stupeň sterilizace filtrací provede úpravou pH supernatantu získaného ve stupni (b) odstředěním na hodnotu 7,0 a následnou filtrací supernatantu přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm .

25

Podle uvedeného druhého provedení se stupeň sterilizace filtrací provede úpravou pH diafiltrovaného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou získaného ve stupni (a) na hodnotu 7,0 a následnou filtrací supernatantu přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm .

- 30 V uvedených dvou výhodných provedeních se pH výhodně upraví pomocí vodného roztoku NaOH. Nicméně je možné použít i jiné vodné alkalické roztoky.

Potom je možné sterilní roztok zahustit s použitím filtru se separačním limitem nominální molekulové hmotnosti 5 000 až 10 000 Daltonů.

Po zahuštění je možné sterilizovaný roztok vysušit vymrazením za získání kyseliny hyaluronové nebo její soli ve formě suchého prášku.

- 35 Kyselina hyaluronová nebo její sůl připravená způsobem čištění podle vynálezu má farmaceuticky přijatelnou čistotu a její výtěžek v uvedeném procesu je asi 70 až 90 % hmotnostních vzhledem k obsahu kyseliny hyaluronové v roztoku suroviny.

Kyselina hyaluronová nebo její sůl, připravená způsobem čištění podle vynálezu je pozoruhodná nepřítomností pyrogenních složek a tím že nevykazuje zánětlivé účinky.

- 40 Kyselina hyaluronová nebo její sůl, připravená způsobem čištění podle vynálezu obsahuje od 90 do 95 % hmotnostních kyseliny hyaluronové obsahující D-glukuronovou kyselinu a N-acetyl-D-glukosamin v poměru 1:1, od asi 3 do 5 % hmotnostních vody, méně než 0,2 % hmotnostních proteinů, méně než 0,3 % hmotnostních nukleových kyselin a méně než 0,3 % hmotnostních neutrálního cukru.
- 45

Způsob podle vynálezu je velmi jednoduchý a je velmi výhodný z ekonomického a z ekologického hlediska, protože nezahrnuje použití jiných prostředků než HCl nebo NaOH.

Při použití způsobu čištění podle vynálezu získaná kyselina hyaluronová nebo její sůl neobsahuje žádné stopy organických rozpouštědel.

- 5 Následující příklady provedení způsobu přípravy kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnosti nebo její soli o farmaceuticky přijatelné čistotě podle vynálezu jsou uvedené pouze pro znázornění vynálezu a žádným způsobem neomezují rozsah vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

10

Příprava vodné půdy obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti z mikrobiologického zdroje

Buňky *Streptococcus equi* se kultivují při teplotě 37 °C ve vhodném médiu následujícího složení:

15	glukosa	60 g
	Soytone	15 g
	extrakt z kvasnic	5 g
	dihydrogenfosforečnan draselný	2,5 g
	síran hořečnatý heptahydrát	1,2 g
20	přečištěná apyrogenní voda	1000 ml

Deset litrů média se vysterylizuje a inokuluje se 1 až 2 % kultury *Streptococcus equi* o optické hustotě (OD) asi 7 stanovené při vlnové délce 650 nm.

- 25 Během fermentace se pH půdy automaticky udržuje na hodnotě 7,4 přidavky NaOH 5 mol/l). Provádí se vzduchování v dávce 1 objemu vzduchu na jeden objem média za minutu, a během celého průběhu fermentace se půda promíchává rychlostí 250 ot./min.

Za 20 hodin se půda sklídí a převede se do vhodné nádrže mající objemovou kapacitu 50 litrů.

Způsob čištění podle prvního výhodného provedení vynálezu.

- 30 Hodnota pH půdy připravené výše popsaným způsobem se za kontinuálního míchání upraví na 2,5 pomocí HCl (6 mol/l) a získá se tak velmi viskózní půda která má vzhled husté kapkovité tekutiny.

- 35 Tato vodná půda se pak čerpá do filtrační komory s příčným rozvodem toku opatřené třemi filtračními vložkami 0,2 µm umístěnými na sobě. Použijí se filtrační vložky SARTOCON cassette, Mod. No. 302 186 07 06 W-SG vyráběné firmou SARTORIUS s velikostí pórů 0,2 µm.

- 40 Na počátku zavádění vodné půdy do filtračního systému se ventil pro odvod filtrátu uzavře aby vodná půda mohla několik minut recirkulovat a docílilo se stability systému a systém se zbavil bublin obsažených v systému s recirkulující tekutinou.

- 45 Pak se ventil pro odvod filtrátu otevře a do nádrže obsahující vodnou půdu se začne zavádět stejnou rychlostí jakou se odvádí filtrát sterilní apyrogenní destilovaná voda aby se zachoval konstantní objem vodné půdy. Vstupní tlak se udržuje na hodnotě v rozmezí 0,1 až 0,3 MPa (1 až 3 bar) výhodně 0,2 MPa (2 bar).

Diafiltrace se ukončí, když absorbance filtrátu při vlnové délce 280 nm dosáhne hodnoty 0,012 (OD). Filtrát se odstraňuje.

- 50 Hodnota pH diafiltrované půdy se pak upraví na 4 pomocí roztoku NaOH (5 mol/l) a pak se půda odstřeďuje při 9000 ot./min a 15 °C v odstředivce s chlazením.

Pak hodnota pH supernatantu upraví na 7,0 roztokem NaOH (5 mol/l) a roztok se zfiltruje přes filtr o velikosti pórů 0,2 µm ke sterilizaci roztoku standardním způsobem.

Sterilní roztok se pak lyofilizuje standardním lyofilizačním způsobem a získá se tak hyaluronát sodný ve formě suchého prášku.

- 5 Výtěžek kyseliny hyaluronové podle tohoto příkladu je asi 85 až 87 % vzhledem k obsahu kyseliny hyaluronové v roztoku obsahujícím vstupní surovinu a připravený produkt má následující parametry:

	– obsah natrium-hyaluronátu	96,5 %
	– vnitřní viskozita (25 °C) = 2100 ml/g (odpovídající molekulová hmotnosti 1,7 x 10 ⁶ Daltonů)	
10	– obsah vody	3,1 %
	– obsah proteinu	0,08 %
	– obsah kyseliny nukleové	0,01 %
	– obsah neutrálního cukru	0,01 %

- 15 Natrium-hyaluronát o vysoké molekulové hmotnosti připravený výše uvedeným způsobem je vhodný pro přípravu farmaceutických kompozic.

Způsob čištění podle druhého výhodného provedení vynálezu

- 20 Hodnota pH vodné půdy objemu 5 litrů obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti připravené výše popsaným způsobem z mikrobiologického zdroje se za kontinuálního míchání upraví na 3,5 pomocí HCl (6 mol/l) a na této hodnotě pH se udržuje v celém průběhu diafiltračního stupně s příčným rozvodem toku k odstranění buněk.

- 25 Tato vodná půda (5 litrů) se pak čerpá do filtrační komory s příčným rozvodem toku opatřené třemi filtračními vložkami 0,2 µm umístěnými na sobě. Použijí se filtrační vložky SARTOCON cassette, Mod. No. 302 186 07 06 W-SG vyráběné firmou SARTORIUS o velikosti pórů 0,2 µm.

- 30 Na počátku zavádění vodné půdy do filtračního systému se ventil pro odvod filtrátu uzavře aby vodná půda mohla několik minut recirkulovat a docílilo se stability systému a systém se zbavil bublin obsažených v systému s recirkulující tekutinou.

- 35 Pak se ventil pro odvod filtrátu otevře a do nádrže obsahující vodnou půdu se zavádí stejnou rychlostí jakou se odvádí filtrát, sterilní apyrogenní destilovaná voda o celkovém objemu odpovídajícím 10 ekvivalentním objemům, aby se zachoval konstantní objem vodné půdy. Vstupní tlak se udržuje na hodnotě v rozmezí 0,1 MPa až 0,3 MPa (1 až 3 bar) výhodně 0,2 MPa (2 bar).

Retenční tekutina se odstraní a filtrát (50 litrů) obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti prostý buněk se zpracuje dále uvedeným způsobem.

- 40 Hodnota pH získaného diafiltrovaného roztoku (50 litrů) obsahující kyselinu hyaluronovou se pak upraví na 2,4 za tvorby velmi viskózního roztoku a hodnota pH se udržuje na výše uvedené hodnotě po celou dobu diafiltračního procesu s příčným rozvodem toku.

- 45 Tato vodná půda (50 litrů) se pak čerpá do filtrační komory s příčným rozvodem toku opatřené třemi filtračními vložkami 300 000 Daltonů umístěných na sobě. Použijí se filtrační vložky SARTOCON cassette, Mod. No. 302 146 790 07 7E-SG vyráběné firmou SARTORIUS s velikostí pórů odpovídající 300 000 Daltonům.

- 50 Na počátku zavádění vodné půdy do filtračního systému se ventil pro odvod filtrátu uzavře aby vodná půda mohla několik minut recirkulovat a docílilo se stability systému a systém se zbavil bublin obsažených v systému s recirkulující tekutinou.

Pak se ventil pro odvod filtrátu otevře a vodná půda se zahustí na objem 7,5 litru. Filtrát (42,5 litru) se odstraní.

- 5 Pak se do nádrže obsahující vodnou půdu zavádí stejnou rychlostí jakou se odvádí filtrát, sterilní apyrogenní destilovaná voda o celkovém objemu rovném patnácti ekvivalentním objemům, aby se zachoval konstantní objem vodné půdy. Vstupní tlak se udržuje na hodnotě v rozmezí od 0,1 MPa do 0,3 MPa (1 až 3 bar) výhodně 0,2 MPa (2 bar). Filtrát (116 litrů) se odstraní.

Pak se napájení vodou ukončí a vodná půda se zahustí.

- 10 Hodnota pH zahuštěného diafiltrovaného roztoku (4 litry) se pak upraví na 7,0 pomocí NaOH (5 mol/l) a roztok se zfiltruje přes statický filtr o velikosti pórů 0,2 μm ke sterilizaci roztoku standardním způsobem sterilizace filtrací.

- 15 Sterilní roztok se pak suší lyofilizací standardním lyofilizačním způsobem a ve formě suchého prášku se tak získá hyaluronát sodný.

Výtěžek v provedení podle uvedeného příkladu je asi 83 až 85 % vztažených na obsah kyseliny hyaluronové v roztoku suroviny a produkt má následující parametry:

- | | | |
|----|---|--------|
| 20 | – obsah natrium–hyaluronátu | 97,0 % |
| | – vnitřní viskozita (25 °C) = 2100 ml/g | |
| | (odpovídající molekulové hmotnosti 1,7 x 10 ⁶ Daltonů) | |
| | – obsah vody | 2,9 % |
| | – obsah proteinu | 0,08 % |
| | – obsah kyseliny nukleové | 0,01 % |
| 25 | – obsah neutrálního cukru | 0,01 % |

Natrium–hyaluronát o vysoké molekulové hmotnosti připravený výše uvedeným způsobem je vhodný pro přípravu farmaceutických kompozic.

30

PATENTOVÉ NÁROKY

35

1. Způsob čištění kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje vedoucí k získání kyseliny hyaluronové nebo její soli o vysoké molekulové hmotnosti o čistotě přijatelné pro farmaceutické použití, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje:

- 40 a) stupeň úpravy pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje na pH v rozmezí 1,7 až 3,3 s následnou diafiltrací uvedeného roztoku při stejné hodnotě pH s použitím filtru o velikosti pórů s nominálním separačním limitem molekulové hmotnosti od 100 000 Daltonů do 0,45 μm ;

- 45 b) stupeň odstranění buněk z vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje, kde uvedený stupeň se provede před stupněm (a), nebo po stupni (a);

- c) stupeň sterilizace.

- 50 2. Způsob čištění podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že vodný roztok obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje, který se nejprve zpracuje buď ve stupni (a), nebo ve stupni (b), je vodná půda obsahující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z mikrobiologického zdroje.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uvedeným mikrobiologickým zdrojem je mikroorganismu rodu *Streptococcus* produkující kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti.
- 5 4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že uvedený mikroorganismus rodu *Streptococcus* se zvolí ze skupiny zahrnující *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* a *Streptococcus pyogenes*.
- 10 5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že ve stupni (a) se hodnota pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti upraví na hodnotu v rozmezí od 2,0 do 2,7 a pak se roztok zpracuje diafiltrací při výše uvedené hodnotě pH.
- 15 6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že ve stupni (a) se hodnota pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti upraví na hodnotu v rozmezí od 2,3 do 2,7 a pak se roztok zpracuje diafiltrací při výše uvedené hodnotě pH.
- 20 7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že ve stupni (a) se hodnota pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti upraví pomocí vodného roztoku HCl.
- 25 8. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že ve stupni sterilizace (c) se sterilizace provede filtrací.
- 30 9. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že po stupni sterilizace (c) následuje stupeň lyofilizace d), ve kterém se lyofilizací sterilizovaného roztoku získá kyselina hyaluronová nebo její sůl ve formě suchého prášku.
- 35 10. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že sterilizovaný roztok se před lyofilizací zahustí.
- 40 11. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že stupeň odstranění buněk (b) se provede po stupni diafiltrace (a).
- 45 12. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že ve stupni (a) se hodnota pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti upraví na hodnotu v rozmezí od 2,5 do 2,6 a pak se roztok zpracuje diafiltrací při výše uvedené hodnotě pH.
- 50 13. Způsob podle nároku 11 nebo 12, **vyznačující se tím**, že filtr použitý v diafiltraci ve stupni (a) má velikost pórů 0,2 μm .
- 55 14. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13, **vyznačující se tím**, že roztok kyseliny hyaluronové se ve stupni (a) diafiltruje tak dlouho, dokud odstraňovaný filtrát nemá hodnotu absorpance (OD) při vlnové délce 280 nm rovnou nebo nižší 0,02.
15. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 11 až 14, **vyznačující se tím**, že stupeň (b) odstranění buněk se provede s použitím odstředování.
16. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že stupeň odstředování zahrnuje úpravu pH diafiltrovaného vodného roztoku získaného ve stupni (a) na hodnotu pH v rozmezí od 3,5 do 5,0 a odstředění diafiltrovaného vodného roztoku za získání supernatantu obsahujícího kyselinu hyaluronovou.

17. Způsob podle nároku 16, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že hodnota pH diafiltrovaného vodného roztoku získaného ve stupni (a) se upraví na 4,0.

5 18. Způsob podle nároku 17, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedená úprava hodnoty pH se provede vodným roztokem NaOH.

10 19. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 15 až 18, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že sterilizační stupeň (c) je stupeň sterilizace filtrací zahrnující úpravu pH supernatantu získaného ve stupni odstředění (b) na hodnotu 7 a filtraci supernatantu filtrem o velikosti pórů 0,2 μm .

10 20. Způsob podle nároku 19, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedená úprava pH se provede vodným roztokem NaOH.

15 21. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že stupeň (b) odstranění buněk se provede před stupněm (a).

22. Způsob podle nároku 21, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že stupeň (b) odstranění buněk je diafiltrační stupeň odstranění buněk.

20 23. Způsob podle nároku 22, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že diafiltrační stupeň (b) odstranění buněk zahrnuje úpravu pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti pocházející z biologického zdroje na hodnotu pH 3,5 a následnou diafiltraci roztoku při stejné hodnotě pH s použitím filtru o velikosti pórů 0,2 μm .

25 24. Způsob podle nároku 23, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedená hodnota pH se upraví vodným roztokem HCl.

30 25. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 21 až 24, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že filtr použitý v diafiltračním stupni (a) má velikost pórů odpovídající separačnímu limitu nominální molekulové hmotnosti 300 000 Daltonů.

35 26. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 21 až 25, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že ve stupni (a) se pH vodného roztoku obsahujícího kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti upraví na 2,4 a potom se roztok diafiltruje při stejné hodnotě pH.

40 27. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 21 až 26, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že sterilizační stupeň (c) je stupeň sterilizace filtrací zahrnující úpravu hodnoty pH vodného roztoku získaného ve stupni (a) diafiltrací na hodnotu 7 a filtraci tohoto vodného roztoku filtrem o velikosti pórů 0,2 μm .

45 28. Způsob podle nároku 27, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že uvedená úprava pH se provede vodným roztokem NaOH.

Konec dokumentu
