

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901731894A1

Publication Date

20101114

Applicant

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A.

Title

IALURONIDASI EXTRACELLULARE DA STREPTOMYCES KOGANEIENSIS

**Titolo: "IALURONIDASI EXTRACELLULARE DA STREPTOMYCES
KOGANEIENSIS"**

Inventori: MESSINA Luciano, VACCARO Susanna,
CARUSO Salvatore, GENNARI Giovanni

5

Descrizione

Stato della tecnica

La ialuronidasi è un enzima idrolitico che
scinde l'acido ialuronico in acido D-glucuronico ed
10 N-acetil glucosammina; in maniera variabile, è anche
capace di degradare altri mucopolisaccaridi acidi del
tessuto connettivo. Alte concentrazioni di
ialuronidasi si trovano, ad esempio, nell'apparato
boccale delle sanguisughe, nei veleni dei serpenti,
15 delle api, degli scorpioni e nel surnatante di
coltura di batteri patogeni come pneumococchi,
streptococchi β -emolitici e *Staphylococcus aureus*.
Nell'organismo umano la ialuronidasi si trova nella
cornea, nel corpo ciliare, nella milza, nella pelle e
20 nei testicoli. Elevate quantità di ialuronidasi si
trovano anche negli spermatozoi, ai quali l'enzima
permette di superare la barriera di acido ialuronico
che protegge l'ovulo.

La ialuronidasi viene utilizzata in medicina
25 nella cura di edemi, stati infiammatori locali,
emorroidi e geloni e per facilitare la

somministrazione sottocutanea di alcuni principi
attivi. È stato anche riportato che alcune
ialuronidasi sono in grado di determinare una
riduzione significativa delle dimensioni dell'infarto
5 del miocardio [1]. In campo veterinario è utilizzata
in soluzioni antibiotiche per il trattamento di
malattie animali, come la mastite bovina. Inoltre, la
ialuronidasi può essere utilizzata come reagente
analitico in alcuni saggi biologici, ad esempio nella
10 determinazione quali/quantitativa dell'acido
ialuronico.

La produzione e la purificazione di ialuronidasi
batterica o animale su scala industriale sono
difficoltose per il fatto che l'enzima diventa
15 instabile in soluzione acquosa e perde attività a
seguito della purificazione.

US 4,258,134 [2] descrive una ialuronidasi
ottenuta mediante dialisi e cromatografia a scambio
ionico su DEAE-cellulosa del surnatante di coltura di
20 *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394.

Si è ora trovato che tale frazione proteica è in
realtà costituita da numerose componenti proteiche
(circa 68 all'elettroforesi bidimensionale), ma che
una sola di esse è dotata di elevata attività
25 ialuronidasica e notevole stabilità.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

L'invenzione riguarda ialuronidasi da *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 comprendente la sequenza amminoacidica N-terminale mostrata in SEQ ID
5 no. 1.

L'enzima è inoltre caratterizzato da un peso molecolare di 21,6 kDa, da un punto isoelettrico (pI) compreso fra 4.4-4.8 e da un'attività enzimatica pari a 40,000 U.I./mg.

10 La ialuronidasi secondo l'invenzione può essere ottenuta con un procedimento comprendente i seguenti passaggi:

a) sottoporre il surnatante ottenuto dalla fermentazione di *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394
15 a cromatografia a scambio cationico debole ed isolare la frazione proteica ad attività ialuronidasica;

b) sottoporre la frazione proteica ad attività ialuronidasica ottenuta al passaggio a) a diafiltrazione e a cromatografia a scambio anionico
20 forte ed isolare la frazione proteica ad attività ialuronidasica;

c) sottoporre la frazione proteica ad attività ialuronidasica ottenuta al passaggio b) a cromatografia a scambio cationico forte ed isolare la
25 frazione proteica ad attività ialuronidasica;

d) sottoporre la frazione proteica ad attività ialuronidasica ottenuta al passaggio c) a cromatografia a scambio anionico forte ed isolare la frazione proteica ad attività ialuronidasica.

5 La fermentazione del microorganismo può essere condotta con metodi noti, in particolare con il metodo descritto in US 4,258,134. Il surnatante ottenuto dopo la fermentazione viene quindi raccolto, centrifugato e filtrato. Inoltre, prima di essere
10 sottoposto ai passaggi cromatografici secondo l'invenzione, il surnatante può essere sottoposto ad ulteriori trattamenti finalizzati alla rimozione di particolato residuo dalla coltura, con metodi e tecniche note all'esperto. Solitamente, il surnatante
15 centrifugato e filtrato viene sottoposto a concentrazione e dialisi. Tipicamente, la concentrazione viene effettuata mediante ultrafiltrazione su appositi filtri in polietersolfone con cut-off compreso fra 5 e 15 kDa,
20 preferibilmente di 10 kDa; solitamente il surnatante viene concentrato da 8 a 12 volte, preferibilmente 10 volte. Una volta verificata la presenza di attività ialuronidasica con un opportuno saggio, ad esempio il saggio di Dorfman [3] modificato, il surnatante
25 concentrato viene dializzato con una soluzione tampone scelta a seconda della resina a scambio

cationico debole utilizzata al passaggio a), in modo tale che la ialuronidasi si trovi in condizioni di pH tali da potersi legare alla resina; quest'ultima contiene gruppi scambiatori carbossialchile, 5 preferibilmente gruppi carbossimetile, come la resina "CM-Sepharose® Fast Flow". Dopo aver opportunamente equilibrato la resina con la stessa soluzione tampone in cui è stata effettuata la dialisi, si carica il campione e si procede all'eluizione con la medesima 10 soluzione per rimuovere le proteine non legate, dopodiché si aumenta il pH per eluire le proteine legate. Quando si utilizza la resina "CM-Sepharose® Fast Flow", dialisi, equilibratura della resina ed eluizione delle proteine non legate vengono 15 effettuate con una soluzione di acetato di sodio 50 mM a pH 4.0, mentre l'eluizione delle proteine legate viene effettuata con una soluzione di acetato di sodio 50 mM a pH 4.5. Le proteine legate che presentano elevata attività ialuronidasica vengono 20 riunite in un'unica frazione e sottoposte alla cromatografia a scambio anionico forte [passaggio b)]. Prima di procedere, le frazioni riunite vengono chiarificate mediante diafiltrazione, condotta con mezzi e metodi noti all'esperto, utilizzando una 25 soluzione tampone che permetta alla ialuronidasi di legarsi alla resina a scambio anionico forte

utilizzata al passaggio b). Tale resina contiene gruppi trietilammonio, tipicamente gruppi trimetilammonio, come la resina HiTrap® Q XL (colonna da 5 ml). Dopo aver equilibrato la resina con la stessa soluzione utilizzata per la diafiltrazione, si carica la frazione ottenuta al passaggio a) e si procede all'eluizione con la medesima soluzione per rimuovere le proteine non legate, poi si aumenta progressivamente forza ionica dell'eluente per eluire le proteine legate. Secondo una realizzazione preferita, si utilizza la resina HiTrap® Q XL e diafiltrazione, equilibratura della colonna ed eluizione delle proteine non legate vengono effettuate con una soluzione tampone Tris-HCl 50 mM a pH 8, mentre l'eluizione delle proteine legate viene effettuata aggiungendo all'eluente NaCl a concentrazione crescente. Eluendo prima con una soluzione Tris-HCl 50 mM, NaCl 35 mM a pH 8 e poi con una soluzione Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM a pH 8 si ottengono così due frazioni, di cui solo la seconda, eluita con la soluzione che contiene NaCl 200 mM, presenta attività ialuronidasi. Tale frazione viene diluita 8 - 12 volte, preferibilmente 10 volte, con una soluzione tampone che consenta alla ialuronidasi di legarsi alla resina a scambio cationico forte utilizzata per il passaggio c). Detta

resina contiene gruppi solfonici, preferibilmente gruppi solfonilalchile, ancor più preferibilmente gruppi solfonilpropile; secondo una realizzazione particolarmente preferita dell'invenzione, si
5 utilizza la resina "HiTrap® SP FF". In pratica, dopo aver equilibrato la resina con la stessa soluzione tampone in cui è stata diluita la frazione ialuronidasica ottenuta al passaggio b) ed aver caricato il campione, si effettua un lavaggio con la
10 stessa soluzione tampone (circa 20 volumi di letto), dopodiché si procede all'eluizione delle proteine legate, aumentando progressivamente il pH dell'eluente. Tipicamente, per la resina HiTrap® SP FF, diluizione, equilibratura e lavaggio della
15 colonna sono effettuati con una soluzione tampone fosfato di sodio 20 mM a pH 4, mentre l'eluizione viene effettuata con tampone fosfato di sodio 50 mM a pH 4.8; le frazioni ad elevata attività ialuronidasica vengono riunite in un'unica frazione,
20 che viene sottoposta alla cromatografia a scambio anionico forte [passaggio d)]. Solitamente, prima della cromatografia, tale frazione viene diluita 8 - 12 volte, preferibilmente 10 volte, in un opportuno tampone di equilibratura, che permetta alla
25 ialuronidasi di legarsi alla resina scelta. La resina per il passaggio d) è una resina a scambio anionico

forte contenente gruppi ammonio quaternari; preferibilmente, si utilizza una colonna Resource Q®. Dopo caricamento del campione, si esegue un lavaggio con lo stesso tampone di equilibratura e si procede
5 all'eluizione delle proteine legate diminuendo progressivamente il pH di 0,5 unità, fino a pH 4. Quando si utilizza una colonna Resource Q®, diluizione della frazione ialuronidasica, equilibratura e lavaggio della colonna dopo
10 caricamento del campione vengono effettuati con acetato di sodio 20 mM a pH 5,5; diminuendo progressivamente il pH come spiegato sopra, si ottengono una prima frazione di proteine a pH 5 e due frazioni di proteine a pH 4; la seconda frazione
15 eluita a pH 4 possiede assorbanza a 280 nm ed attività enzimatica superiori rispetto alle altre due frazioni, come si evince dalla Figura 2. Sottoponendo tale frazione a cromatografia SDS-PAGE 12% e *silver staining* (figura 6) si osserva una sola banda
20 proteica con un peso molecolare apparente di circa 25 kDa. In particolare, il 99% della ialuronidasi purificata con il procedimento sopra descritto ha un peso molecolare apparente di circa 25 kDa. Tale proteina costituisce solo il 5% circa della
25 ialuronidasi presente nel surnatante ottenuto dopo la fermentazione; pertanto, il procedimento consente di

ottenere un arricchimento di circa 20 volte con una resa del 30% circa.

Rispetto ad altre ialuronidasi finora note, quella dell'invenzione è altamente stabile in
5 soluzione acquosa, non è suscettibile nei confronti dell'azione di enzimi proteolitici e ha purezza HPLC superiore al 98% (Fig. 5), che è necessaria per uso terapeutico; pertanto, essa può trovare impiego, da sola o in associazione con altri principi attivi,
10 nella preparazione di composizioni farmaceutiche o veterinarie destinate al trattamento di patologie in cui sia necessario o vantaggioso degradare l'acido ialuronico presente nell'organo o tessuto affetto dalla patologia.

15 Grazie all'elevata stabilità in soluzione acquosa, la ialuronidasi dell'invenzione può essere formulata anche in forma di composizioni a base acquosa, come soluzioni, creme idrofile, idrogeli, oltre che in forma di prodotti lipofili come unguenti
20 o creme oleose.

Per quanto riguarda l'uso umano, la ialuronidasi dell'invenzione può essere utilizzata per la preparazione di composizioni farmaceutiche destinate al trattamento di edemi, in particolare di edemi su
25 base traumatica, o di stati infiammatori, come la sindrome emorroidaria; inoltre, può essere utilizzata

per la preparazione di composizioni destinate al
trattamento di geloni. La ialuronidasi
dell'invenzione può essere utilizzata anche in
associazione con altri farmaci dei quali sia
5 necessario o vantaggioso aumentare la
biodisponibilità.

Ad esempio, per il trattamento di edemi su base
traumatica, sono particolarmente vantaggiose
associazioni della ialuronidasi secondo l'invenzione
10 con agenti anticoagulanti e/o fibrinolitici. Tali
associazioni potranno inoltre contenere eventualmente
uno o più agenti antinfiammatori steroidei o non
steroidi. Inoltre, a queste composizioni potrà
essere vantaggiosamente associato acido ialuronico
15 solfatato, che è noto possedere, oltre a proprietà
antinfiammatorie, anche proprietà antitrombotiche ed
anticoagulanti. Un esempio di acido ialuronico
solfatato utilizzabile a questo scopo è descritto, ad
esempio, in EP 0702699.

20 Associazioni della ialuronidasi secondo
l'invenzione con altri principi attivi sono
vantaggiose anche nel caso di preparazioni
iniettabili contenenti principi attivi a peso
molecolare particolarmente elevato, ad esempio
25 anticorpi monoclonali, citochine o enzimi, che sono
solitamente somministrati per via endovenosa; la

ialuronidasi permette la somministrazione degli stessi per via sottocutanea, secondo la cosiddetta procedura EASI (Enzymatically-Augmented Subcutaneous Infusion), che viene impiegata soprattutto per il
5 ricambio di fluidi in pazienti terminali, in modo tale da limitare o evitare l'assistenza infermieristica. La ialuronidasi secondo l'invenzione può anche essere impiegata per la preparazione di composizioni farmaceutiche destinate al trattamento
10 di tumori solidi resistenti; essa infatti, degradando l'acido ialuronico, abbassa la pressione dei fluidi interstiziali nella massa tumorale, rallentandone o inibendone la crescita. Per lo stesso motivo, essa aumenta anche l'efficacia di principi attivi
15 antitumorali ad essa eventualmente associati. Pertanto, un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda composizioni farmaceutiche contenenti ialuronidasi in associazione con uno o più principi attivi antitumorali, come alcaloidi della Vinca
20 (Vinblastina, Vincristina, Vinorelbina) e tassani (Paclitaxel).

Un ulteriore impiego terapeutico della ialuronidasi secondo l'invenzione riguarda il trattamento di forme allergiche mediate da IgE
25 tramite desensibilizzazione con enzima potenziato (EPD = *Enzyme Potentiated Desensitization*), che

consiste nella somministrazione di dosi estremamente basse di allergeni per desensibilizzare soggetti ad essi sensibili. Associando la ialuronidasi ad un allergene è possibile aumentare l'efficacia del
5 trattamento, poiché l'allergene raggiunge più facilmente il sito d'azione. Pertanto, un ulteriore oggetto dell'invenzione consiste in composizioni farmaceutiche contenenti ialuronidasi in associazione con uno o più allergeni che inducono reazioni
10 allergiche mediate da IgE. La ialuronidasi trova inoltre impiego come fattore di diffusione di farmaci per uso odontoiatrico nel trattamento di patologie del cavo orale, ad esempio anestetici locali ed antibiotici; pertanto, secondo un ulteriore aspetto,
15 l'invenzione riguarda composizioni farmaceutiche contenenti la ialuronidasi secondo l'invenzione in associazione con uno o più anestetici locali o antibiotici.

In oftalmologia, la ialuronidasi permette di
20 accelerare notevolmente il trattamento di emorragie vitreali spontanee e può essere utilizzata, da sola o in associazione con altri principi attivi, nella preparazione di forme farmaceutiche per uso oftalmico, quali soluzioni, sospensioni, gel, creme e
25 unguenti, destinate al trattamento di dette emorragie.

Per quanto riguarda invece l'uso veterinario, una patologia che può essere efficacemente trattata con la ialuronidasi dell'invenzione è la mastite bovina; in tal caso, la ialuronidasi potrà essere
5 somministrata in associazione con antibiotici, come Penicillina G, cefalosporine di I-IV generazione ed amminopenicilline potenziate.

Le composizioni farmaceutiche possono essere preparate con tecniche ed eccipienti noti
10 all'esperto, ad esempio secondo quanto descritto in Remington, "The Science and the Practice of Pharmacy", 21st ed. (Lippincott, Williams & Wilkins); tali composizioni comprendono, in particolare, preparazioni iniettabili e preparazioni topiche per
15 applicazione dermica, transdermica e oftalmica. In particolare, le preparazioni topiche per applicazione epidermica possono essere scelte fra creme, gel, unguenti e soluzioni per nebulizzazione, mentre le preparazioni topiche per applicazione oftalmica
20 possono essere scelte fra creme, gel, unguenti soluzioni e sospensioni. Come precedentemente indicato, grazie alla sua stabilità in soluzione acquosa, la ialuronidasi secondo l'invenzione può essere formulata in prodotti a base acquosa; la
25 scelta fra una formulazione a base acquosa ed una formulazione a base oleosa potrà essere effettuata da

un tecnico esperto sulla base delle conoscenze comuni nel settore della tecnologia farmaceutica, a seconda degli altri ingredienti presenti nella composizione.

Infine, la ialuronidasi secondo l'invenzione può
5 essere utilizzata come reagente in saggi biochimici per la determinazione quali/quantitativa dell'acido ialuronico.

Descrizione delle figure

FIG. 1: elettroforesi 2D della frazione DEAE
10 positiva all'attività ialuronidasica proveniente da surnatante di coltura di *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394.

FIG. 2: cromatogramma della ialuronidasi da *Streptomyces koganeiensis* ottenuta dopo cromatografia
15 su colonna Resource Q® (passaggio d).

FIG. 3: profilo proteico in SDS-PAGE al 12% delle frazioni ottenute al termine di ogni passaggio di purificazione secondo l'invenzione rispetto al profilo proteico del surnatante.

20 FIG. 4: analisi della purezza della ialuronidasi mediante HPLC su colonna a gel filtrazione Bio-Sil SEC [passaggio d)].

FIG. 5: analisi in SDS-PAGE e spettri di assorbimento del sequenziamento N-terminale della
25 ialuronidasi ottenuta al passaggio d).

FIG. 6: analisi SDS-PAGE non denaturante per la determinazione dell'attività ialuronidasica; confronto fra la ialuronidasi ottenuta al passaggio d) e la ialuronidasi ottenuta secondo US 4,258,134.

5 FIG. 7: determinazione del peso molecolare mediante spettrometria di massa della ialuronidasi ottenuta al passaggio d).

FIG. 8: determinazione del punto isoelettrico della ialuronidasi ottenuta al passaggio d).

10 FIG. 9: confronto fra l'attività enzimatica di alcune ialuronidasi presenti in commercio e la ialuronidasi secondo l'invenzione.

PARTE SPERIMENTALE

L'invenzione verrà ora descritta in maggior
15 dettaglio nella seguente parte sperimentale, che illustra il modo migliore per attuare l'invenzione, che non deve essere inteso in senso limitativo.

MATERIALI E METODI

Coltivazione del microrganismo

20 *S. koganeiensis* è stato ottenuto da American Type Culture Collection (ATCC 31394) e coltivato come descritto in [2]. Brevemente, il microorganismo è stato fatto crescere in 1 litro di terreno di coltura [(20 g/l di estratto di lievito (Organotechnie) e 5
25 g/l di peptone di soia (Solabia), a pH 6.9)] a 30 °C, agitando a 150 rpm e per circa 16 ore. Dopo la

crescita, la coltura è stata utilizzata per inoculare un fermentatore da 50 litri (Biostat U, B.BRAUN) contenente 30 litri di apposito terreno [(10 g/l di estratto di lievito (Organotechnie), 5 g/l di peptone di soia (Solabia), 3 g/l di estratto di malto (Costantino), 3 g/l di destrina tipo I (Sigma), 0,2 g/l di antischiuma (Sigma)]. Prima di effettuare l'inoculo, il pH è stato portato a 7.0 con NaOH; durante la fermentazione il pH è stato monitorato, ma non controllato, e la temperatura è stata mantenuta a 30°C durante tutta la fermentazione, mentre l'agitazione è stata mantenuta a 300 rpm, con un'aerazione di 1,6 VVM (litri aria/ litri terreno di fermentazione/min). La fermentazione ha avuto una durata di 48h, tempo che coincideva con la massima produzione di attività enzimatica ialuronidasica (1×10^5 - $1,3 \times 10^5$ U.I./litro) nel surnatante di coltura.

Al termine della fermentazione la coltura è stata centrifugata a 5000 rpm per 30 minuti a 4°C (SORVALL Evolution RC) e filtrata con filtri a flusso tangenziale in polietersulfone di 0.2 µm, in modo tale da eliminare la biomassa di *Streptomyces koganeiensis* (che si presentava sotto forma di aggregati ifali rotondeggianti di 1-4 mm di diametro) ed ottenere un surnatante chiarificato contenente ialuronidasi.

Determinazione dell'attività ialuronidasica

L'attività ialuronidasica è stata misurata con il metodo Dorfman [3] modificato. Brevemente, il prodotto ottenuto dalla cromatografia su cellulosa DEAE è stato diluito in tampone fosfato 0,03 M, NaCl 0,82%, pH 6.3 e 1 ml della soluzione così ottenuta è stato miscelato con 1 ml di tampone substrato (tampone fosfato 0,03 M, NaC 10,82%, pH 6.3) contenente 0,5 mg di acido ialuronico. La digestione enzimatica è stata effettuata a 37°C per 30 minuti e alla fine del processo di incubazione è stata generata torbidità aggiungendo 4 ml di soluzione acida a base di siero di cavallo (SIGMA). La densità ottica a 640 nm è stata misurata esattamente 30 minuti dopo l'aggiunta della soluzione acida a base di siero di cavallo. Uno standard di ialuronidasi da testicolo di mammifero (EDQM, FIP Ialuronidasi, H1115000) contenente 328 U.I./mg è stato utilizzato per costruire una curva standard e l'attività (in unità) dei campioni è stata calcolata utilizzando questa curva.

Cromatografie

Le resine e le colonne cromatografiche sono state acquistate da GE Helthcare Life Sciences e mantenute secondo le specifiche fornite dal fornitore. Le fasi di equilibratura ed eluizione

sono state effettuate con un sistema Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC; AKTA explorer 100, GE Healthcare) ad un flusso di 40-50 ml/min per la prima cromatografia e di 5 ml/min per le cromatografie
5 seguenti. Al termine di ogni passaggio cromatografico l'attività ialuronidasica è stata controllata con il saggio di Dorfman modificato descritto al passaggio precedente.

Per le analisi di purezza mediante gel
10 filtrazione è stato utilizzato lo strumento HPLC LC-10AD (SHIMADZU) con una colonna Bio-Sil SEC (BIO-RAD), eluendo con NaH_2PO_4 0,05M, Na_2HPO_4 0,05M, 0,15 M NaCl, pH 6.6, a 1 ml/min. La lunghezza d'onda d'assorbimento utilizzata era di 214 nm (SPD-10A,
15 SHIMADZU). La purezza della proteina è stata determinata utilizzando il software LC solution 1.21 SP1.

Elettroforesi SDS-PAGE

Le analisi elettroforetiche su gel di
20 poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) sono state effettuate utilizzando il metodo di Laemmli [4] su gel di poliacrilammide al 12%, utilizzando un Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) secondo le istruzioni del fornitore. Il peso molecolare della
25 proteina purificata è stato stimato mediante

confronto con le proteine standard a basso peso molecolare (BIO-RAD).

Elettroforesi bidimensionale ed isoelettrofocalizzazione

5 La frazione proteica da analizzare viene miscelata in un opportuno tampone di caricamento e caricata su strisce IPG a pH 3-10 (ReadyStrips 7 cm, BIO-RAD); si incuba a 25°C fino ad assorbimento del campione e si carica la striscia sul PROTEAN IEF Cell
10 (BIO-RAD) per l'isoelettrofocalizzazione (IEF).

 Al termine della corsa di isoelettrofocalizzazione (prima dimensione) la striscia viene equilibrata in un opportuno tampone di caricamento e di corsa, quindi è stata caricata in
15 seconda dimensione su SDS-PAGE al 12%, utilizzando celle Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD).

Analisi densitometriche

 I gel di poliacrilammide opportunamente colorati con Silver Stain Plus (BIO-RAD) o Coomassie (BIO-
20 RAD), sono stati acquisiti con un acquisitore di immagine da laboratorio ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), mentre le analisi (quantitative e qualitative) sono state effettuate impiegando il software di analisi dell'immagine ImageQuant TL (GE
25 Healthcare). Le analisi d'immagine su gel di poliacrilammide 2D SDS-PAGE sono state effettuate

invece impiegando il software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

Spettrometria di massa

Le analisi di spettrometria di massa per la
5 determinazione del peso molecolare sono state
effettuate utilizzando lo spettrometro di massa
Ultraflex III TOF/TOF (BRUKER) ed i markers Bruker
Protein Mix 1, mentre l'identificazione della
proteina viene effettuata utilizzando i valori di
10 massa accurati dei peptidi determinati mediante il
sistema MALDI-MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems).

Sequenziamento dell'estremità N-terminale

Il sequenziamento amminoacidico N-terminale è
stato effettuato secondo il metodo degradazione di
15 Edman utilizzando un sequenziatore automatico di
proteine in fase liquida pulsata (ABI-Perkin Elmer
Mod. 477A). Il software BLAST [5] è stato utilizzato
per condurre ricerche di omologia sulla banca dati
GenBank e su quella del progetto genoma delle specie
20 *Streptomyces* disponibili sul web.

Confronto fra l'attività enzimatica di diverse specie di ialuronidasi

Il potenziale enzimatico della ialuronidasi
secondo l'invenzione è stato valutato mediante
25 confronto con l'attività enzimatica di alcune fra le
ialuronidasi commerciali più utilizzate (Standard di

ialuronidasi FIP, ialuronidasi da testicolo bovino
tipo I-S (SIGMA), ialuronidasi da testicolo bovino
tipo VI-S (SIGMA), ialuronidasi da testicolo di
pecora di tipo V (SIGMA), ialuronidasi da
5 *Streptomyces hyalurolyticus* (SIGMA)), utilizzando il
saggio enzimatico descritto sopra ed il valore di
attività è stato riportato graficamente in figura 9
come U.I./mg (la concentrazione proteica è stata
determinata mediante BCA Protein Assay Reagent Kit,
10 PIERCE).

**ESEMPIO 1 (ESEMPIO DI RIFERIMENTO) - OTTENIMENTO,
PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI IALURONIDASI DA *STREPTOMYCES*
KOGANEIENSIS SECONDO US 4,258,134**

S. koganeiensis 31394 ATCC è stato coltivato
15 come descritto in Materiali e Metodi; il surnatante
ottenuto dalla centrifugazione, opportunamente
filtrato con filtri a flusso tangenziale, è stato
sottoposto a cromatografia a scambio anionico debole
su DEAE-cellulosa. Brevemente, 1,2 kg di DEAE-
20 cellulosa è stata equilibrata con tampone sodio
fosfato 25 mM a pH 7.0 ed impaccata, quindi il
surnatante chiarificato è stato caricato ed eluito
con lo stesso tampone; la frazione raccolta dopo
cromatografia è stata concentrata mediante
25 ultrafiltrazione e dializzata con 10 volumi di acqua
distillata (MilliQ, Millipore). Il prodotto così

ottenuto è stato filtrato su filtri in polietersulfone da 0.2 μm e sottoposto a saggio per la determinazione dell'attività ialuronidasica, ad SDS-PAGE, ad elettroforesi bidimensionale e ad
5 analisi densitometrica.

Per quanto riguarda l'elettroforesi bidimensionale, il cui risultato è riportato in figura 1, un'aliquota da 600 μl della frazione ad attività ialuronidasica ottenuta dalla cromatografia
10 è stata concentrata utilizzando colonne BIOMAX 5k (Millipore) fino ad un volume di circa 20 μl (circa 864U di ialuronidasi). L'aliquota concentrata è stata miscelata con 125 μl di tampone di caricamento (urea 8M, CHAPS 2%, ditiotreitolo (DTT) 50mM, 0,2% (w/v)
15 anfoliti Bio-Lyte 2/10 e blu di bromofenolo) e caricata su strisce IPG a pH 3-10 (ReadyStrips 7 cm, BIO-RAD), incubando il campione sulla striscia a 25°C per 11 ore. Dopo 11 ore di assorbimento del campione, la striscia è stata caricata sul PROTEAN IEF Cell
20 (BIO-RAD) per l'isoelettrofocalizzazione (IEF).

Al termine della corsa di isoelettrofocalizzazione (prima dimensione) la striscia è stata prima equilibrata per 15 minuti con un primo tampone [(urea 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M
25 (pH 8.8), glicerolo 20%, e DTT 2% (w/v)], poi con un secondo tampone [6M urea, 2% SDS, 0,375 M Tris-HCl

(pH 8.8), 20% glicerolo]. Dopo l'equilibratura, la striscia è stata caricata in seconda dimensione su SDS-PAGE al 12%, utilizzando celle Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD). Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato colorato con Coomassie PhastGel Blue R ed analizzato, dopo scansione, mediante software d'immagine come descritto in materiali e metodi (Figura 1).

ESEMPIO 2 - OTTENIMENTO, PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE
DELLA IALURONIDASI DA *STREPTOMYCES KOGANEIENSIS* SECONDO L'INVENZIONE

2a) Ottenimento e purificazione

Preparazione del campione

Il surnatante chiarificato (circa 30 litri), ottenuto dalla fermentazione di *Streptomyces koganeiensis* ATCC31394, come descritto in Materiali e Metodi, è stato concentrato 10 volte mediante ultrafiltrazione attraverso filtri in polietersulfone con 10kDa di cut-off e ne è stata misurata l'attività ialuronidasica. Il surnatante concentrato è stato quindi dializzato (10 volumi) con una soluzione di acetato di sodio 50 mM a pH 4.0 e sottoposto al passaggio a).

**Passaggio a) Cromatografia a scambio cationico
debole**

Il surnatante concentrato e dializzato è stato
caricato su 200 ml di resina CM-Sepharose® Fast Flow
5 (GE Healthcare), impaccata in una colonna XK-50 (GE
Healthcare) ed equilibrata con 10 volumi di letto
(bed volumes, BV) di tampone acetato di sodio 50 mM a
pH 4.0.

Dopo il caricamento, la colonna è stata lavata
10 con 3 BV del medesimo tampone, quindi le proteine
legate sono state eluite con 3 BV di una soluzione
tampone acetato di sodio 50 mM a pH 4.5. Le proteine
eluite sono state raccolte in un'unica frazione
avente volume di circa 200 ml e sottoposte a saggio
15 di attività ialuronidasica.

**Passaggio b) Diafiltrazione e cromatografia a
scambio anionico forte**

La frazione enzimaticamente attiva ottenuta al
passaggio a) è stata sottoposta a diafiltrazione per
20 10 volte con un tampone di equilibratura Tris-HCl 50
mM, pH 8, dopodiché è stata caricata su una colonna
HiTrap® Q XL (5ml), precedentemente equilibrata con
20 BV del medesimo tampone. Dopo caricamento del
campione, è stato effettuato un lavaggio con 20 BV di
25 tampone, quindi le proteine legate sono state eluite
prima con 12 BV di tampone Tris-HCl 50 mM, NaCl 35 mM

a pH 8 per rimuovere le impurezze costituite da proteine non attive, dopodiché la frazione enzimaticamente attiva è stata eluita con 14 BV di tampone Tris-HCl 50mM, NaCl 200 mM a pH 8 e raccolta
5 in un volume finale di circa 50 ml. Equilibratura, lavaggio ed eluizione sono stati effettuati al flusso di 5 ml/min.

Passaggio c) Cromatografia a scambio cationico forte

10 La frazione proveniente dal passaggio b) è stata diluita 10 volte con un tampone acetato di sodio 20 mM a pH 4 e caricata su colonna HiTrap® SP FF, precedentemente equilibrata con 20 BV della medesima
15 medesima soluzione, le proteine legate sono state eluite con 10 BV di un tampone fosfato di sodio 50 mM a pH 4. Le proteine eluite sono state raccolte in una frazione avente volume di circa 45 ml e sottoposte a saggio di attività enzimatica ialuronidasica.
20 Equilibratura, lavaggio ed eluizione sono stati effettuati al flusso di 5ml/min.

Passaggio d) Cromatografia a scambio anionico forte

25 La frazione enzimaticamente attiva ottenuta al passaggio c) è stata diluita 10 volte in un tampone acetato di sodio 20mM a pH 5,5 e caricata su una

colonna Resource Q®, precedentemente equilibrata con 20 BV del medesimo tampone. Dopo il caricamento del campione è stato effettuato un lavaggio con 20 BV del medesimo tampone, quindi il pH è stato abbassato a 5 ed è stata effettuata un'eluizione con 10 BV di soluzione in modo tale da rimuovere le impurezze costituite da proteine non attive. Il pH è stato poi ulteriormente abbassato a 4 ed è stata effettuata un'eluizione con 15 BV di tampone. Il secondo picco eluito a questo valore di pH, avente assorbanza maggiore, è stato raccolto in un volume finale di circa 10-15 ml e sottoposto ad ultrafiltrazione e a dialisi con 10 volumi di acqua MilliQ (Millipore). Equilibratura, lavaggio ed eluizione sono stati effettuati ad un flusso di 5 ml/min.

Tutte le frazioni proteiche eluite, sia quelle enzimaticamente attive che quelle non attive o poco attive, sono state quindi analizzate mediante SDS-PAGE al 12% come descritto in Materiali e Metodi e poi colorate con *silver stain* secondo le istruzioni fornite dal fornitore; in tutte le frazioni con la più alta attività ialuronidasica era presente una banda proteica più marcata a circa 25 kDa (Figura 3).

2b) Analisi e caratterizzazione

Analisi HPLC mediante gel filtrazione

La frazione ottenuta al passaggio d) è stata sottoposta ad HPLC su colonna a gel filtrazione come descritto in Materiali e Metodi. Il risultato
5 dell'analisi è riportato in figura 4.

Spettrometria di massa

La frazione ottenuta al passaggio d) è stata sottoposta ad elettroforesi su SDS-PAGE al 12%. Al termine della corsa il gel è stato colorato con
10 Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD) e la proteina scissa dal gel è stata digerita con tripsina (BIO-RAD). Un profilo di masse peptidiche è stato ottenuto utilizzando il sistema MALDI-MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems). Le masse peptidiche ottenute
15 sono state utilizzate per le ricerche in banca dati per l'identificazione della proteina.

Sequenziamento N-terminale

La frazione ottenuta al passaggio d) è stata sottoposta ad elettroforesi SDS-PAGE su gel al 12%,
20 come descritto sopra, quindi a blotting su membrana di poliviniliden difluoruro (BIO-RAD) e colorata secondo le istruzioni fornite dal fornitore. La banda è stata scissa con un bisturi, cercando di ottenere un pezzetto con le più piccole dimensioni possibili
25 (3 mm x 10 mm) ed è stata caricata nella camera di reazione del sequenziatore.

Determinazione dell'attività ialuronidasica mediante SDS-PAGE non denaturante

I campioni proteici da analizzare per l'attività enzimatica ialuronidasica [ialuronidasi e proteine non legate ottenute al passaggio d) e ialuronidasi
5 ottenuta dalla cromatografia su DEAE-cellulosa] sono stati frazionati in doppio su un gel nativo di poliacrilammide all'8% impregnato con 0,17 mg/ml di acido ialuronico. Dopo corsa elettroforetica, il gel
10 è stato lavato tre volte con formiato di sodio 0,1 M, NaCl 0,05M, pH 4.0, ed incubato durante la notte nella stessa soluzione a 37 °C. Il gel è stato lavato tre volte in acido acetico al 3% e colorato per 2h a temperatura ambiente in una soluzione di Alcian blue
15 allo 0,5% (w/v) (SIGMA) ed acido acetico al 3%. Il gel è stato poi decolorato in una soluzione di sodio acetato al 7% per almeno 1h.

Le proteine che mostravano attività ialuronidasica sono state rilevate come bande chiare
20 su sfondo blu del gel [6]. Un Native-PAGE preparato allo stesso modo, ma colorato con Coomassie Brilliant Blue G-250 (BIO-RAD) è stato utilizzato come controllo (Figura 6).

Eluizione passiva della proteina da gel nativo 25 di poliacrilammide

La banda proteica ad attività ialuronidasica è stata scissa dal gel nativo di poliacrilammide colorato con Coomassie Brilliant Blue G-250 e posta all'interno di una provetta sterile da 1,5 ml. 0,5 ml
5 di tampone di eluizione (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, e 0,1 mM EDTA; pH 7.5) sono stati aggiunti al pezzo di gel scisso, in modo tale che venisse immerso completamente. Il pezzo di gel è stato omogenato con un pestello sterile ed incubato in uno shaker
10 orbitante a 30°C durante la notte. Dopo incubazione, il gel omogenato è stato centrifugato a 5,000-10,000 x g (centrifuga 5402, eppendorf) per 10 minuti e, con molta attenzione, il surnatante è stato prelevato e trasferito in una nuova provetta da 1,5 ml. Dopo
15 essere stato concentrato 10 volte con colonna BIOMAX 5k (Millipore), il surnatante è stato controllato per la presenza della proteina eluita mediante SDS-PAGE, ed in seguito è stato sottoposto a saggio di attività ialuronidasica e, per conferma, a sequenziamento N-
20 terminale (Figura 5).

Determinazione del peso molecolare della proteina mediante spettrometria di massa

1 µl di ialuronidasi (circa 0,5 µg) è stato miscelato con 1 µl di una soluzione costituita da 20
25 µg/µl di acido sinapinico (SA) in acetonitrile al 50% con lo 0,1% di acido trifluoroacetico (TFA). La

miscela ottenuta è stata trasferita su piastra MALDI e sottoposta ad analisi come indicato in Materiali e Metodi. Il risultato dell'analisi è riportato in figura 7.

5 **Isoelettrofocalizzazione**

Un'aliquota da 20 μ l (20 μ g) di ialuronidasi ottenuta al passaggio d), è stata miscelata con 125 μ l di tampone di caricamento [urea 8 M, CHAPS 2%, 50mM ditiotreitolo (DTT), 0,2% (w/v) di anfoliti Bio-
10 Lyte 2/10 e blue di bromofenolo] e caricata su striscia IPG a pH 3-10 (ReadyStrips 7 cm, BIO-RAD), incubando il campione sulla striscia a 25°C per 11 ore. Dopo 11 ore di assorbimento del campione, la striscia è stata caricata per
15 l'isoelettrofocalizzazione (IEF) sul PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD). Al termine della corsa di isoelettrofocalizzazione, la striscia è stata asciugata con carta da filtro (Whatman), inumidita con acqua MilliQ, e colorata per 45 minuti
20 utilizzando la soluzione IEF Gel Staining (BIO-RAD). La striscia è stata decolorata per 1 ora o più con la soluzione decolorante (Destain solution, Coomassie R-250, BIO-RAD). Il punto isoelettrico del campione è stato determinato mediante confronto con i punti
25 isoelettrici degli standard di riferimento (IEF

Marker pH 3-10, SERVA). Il risultato dell'analisi è riportato in figura 8.

Confronto fra l'attività enzimatica di diverse specie di ialuronidasi

5 Il risultato di questo saggio dimostra che la ialuronidasi secondo l'invenzione possiede un'attività circa tre volte superiore a quella più attiva fra quelle utilizzate per il confronto (Figura 9).

10 Sequenziamento

Il sequenziamento dell'estremità N-terminale, condotto come descritto in materiali e metodi, ha permesso di stabilire che essa contiene la seguente sequenza amminoacidica:

15 Ala-Gly-Glu-Asn-Gly-Ala-Thr-Thr-Thr-Phe-Asp-Gly-Pro-Val-Ala (SEQ ID No. 1)

ESEMPIO 3 - PREPARAZIONI FARMACEUTICHE

Preparazione 1 - gel idrofilo

Componenti	Quantità (U.I o mg/1g di idrogel)
Ialuronidasi	150 U.I
Carbomer 974P	15 mg
Glicerolo	100 mg
Glicole propilenico	66,75 mg
Trietanolamina (TEA)	13,25 mg
Glicole polietilenico 400	66,75 mg
Metil p-idrossibenzoato	2 mg
Propil p-idrossibenzoato	0,2 mg
Acqua purificata	q.b. a 1g

Metil- e propil- parabene sono stati sciolti in acqua purificata a 80°C. Dopo raffreddamento della soluzione a temperatura ambiente, è stata aggiunta la ialuronidasi, agitando fino a completa dissoluzione, dopodiché è stato aggiunto PEG 400, continuando ad agitare fino a dissoluzione. A questa soluzione è stato aggiunto Carbomer® 974P, mantenendo l'agitazione fino a dispersione omogenea e a completa idratazione di quest'ultimo, quindi è stata aggiunta TEA per ottenere la gelificazione della fase acquosa. Infine, sempre sotto agitazione, sono stati aggiunti glicerolo e glicole propilenico.

Preparazione 2 - Crema idrofila (emulsione o/a)

Componenti	Quantità (U.I o mg/1g di crema)
Ialuronidasi	150 U.I
Tefose 1500	110 mg
Glicerolo	80 mg
Acido stearico	33 mg
Paraffina Liquida	40 mg
Metil p-idrossibenzoato	1 mg
Acqua purificata	q.b. a 1g

Per la preparazione della fase oleosa, paraffina liquida, acido stearico e Tefose® 1500 sono stati fusi sotto agitazione a 50°C. Separatamente è stata preparata la fase acquosa mediante iniziale solubilizzazione a 80°C di metil-parabene, successivo raffreddamento a temperatura ambiente ed incorporazione di glicerolo e ialuronidasi sotto agitazione fino a completa dissoluzione.

La fase acquosa è stata aggiunta a quella oleosa, procedendo all'emulsione, dopodiché l'emulsione O/A ottenuta è stata raffreddata sotto agitazione a temperatura ambiente.

5 **Preparazione 3 - Unguento**

Componenti	Quantità (U.I o mg/1g di unguento)
Ialuronidasi	150 U.I
Paraffina liquida leggera	200 mg
Vaselina bianca	q.b. a 1g

L'unguento base è stato preparato per fusione sotto agitazione a 70°C di paraffina liquida leggera e vaselina bianca. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, è stata incorporata la ialuronidasi, miscelando fino ad ottenimento di una sospensione omogenea.

Preparazione 4 - Lipogel

Componenti	Quantità U.I o mg/1g di lipogel)
Ialuronidasi	150 U.I
Olio di ricino idrogenato	10 mg
Alcol cetostearilico	50 mg
Vaselina bianca	365mg
Paraffina liquida leggera	q.b. a 1g

Paraffina liquida leggera, vaselina bianca e l'alcool cetilstearyllico sono stati fusi sotto agitazione a 90°C, dopodiché, sotto agitazione, è stato aggiunto olio di ricino idrogenato (agente lipogelificante) fino a soluzione omogenea. Dopo aver raffreddato lentamente fino a temperatura ambiente, è

stata incorporata la ialuronidasi, miscelando fino ad ottenimento di una sospensione omogenea.

Preparazione 5 - Soluzioni iniettabili per uso intramuscolare o sottocutaneo

Componenti	Quantità (U.I o mg/ml di sol.)
Ialuronidasi	200 U.I
Lattosio	0,93 mg
Potassio Fosfato Dibasico	0,36
Potassio Fosfato Monobasico	0,23
Cloruro di sodio	9

5 Lattosio e ialuronidasi sono stati sciolti, sotto agitazione, in una soluzione fisiologica tamponata a pH 6.4 - 7.2, preparata a temperatura ambiente e la soluzione così ottenuta è stata filtrata su filtri da 0.22 micron.

10

Bibliografia

[1] Maclean, D., Fishbein, MC., Maroko, PR. & E Braunwald E. 1976. *Science*, 194: 99-200.

[2] Yoshida, K., Fujii, T., Kikuchi, H. 1981. US
5 Patent: 4258134.

[3] Dorfman, A. 1955. *Methods in Enzymology*, 1: 166-173.

[4] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage
10 T4. *Nature (London)* 227:680-685.

[5] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

15 [6] Guntenhoener, M.W., Pogrel, M.A., and Stern, R.1992. *Matrix* 12, 388-396.

[7] Lachmann S, Rommeleare J, Nüesch JP. 2003. Novel PKCeta is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of
20 minute virus of mice. *J Virol* 2003;77(14):8048-60.

RIVENDICAZIONI

- 1) Ialuronidasi da *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 comprendente la sequenza amminoacidica N-terminale mostrata in SEQ. ID. No. 1.
- 2) Ialuronidasi secondo la rivendicazione 1 caratterizzata da un peso molecolare di 21,6 kDa, da un punto isoelettrico (pI) compreso fra 4.4-4.8 e da un'attività enzimatica di 40,000 U.I./mg.
- 3) Procedimento per la preparazione della ialuronidasi secondo la rivendicazione 1 o 2 comprendente i seguenti passaggi:
- a) sottoporre il surnatante ottenuto dalla fermentazione di *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 a cromatografia a scambio cationico debole ed isolare la frazione proteica ad attività ialuronidasica;
- b) sottoporre la frazione proteica ad attività ialuronidasica ottenuta al passaggio a) a diafiltrazione e a cromatografia a scambio anionico forte ed isolare la frazione proteica ad attività ialuronidasica;
- c) sottoporre la frazione proteica ad attività ialuronidasica ottenuta al passaggio b) a cromatografia a scambio cationico forte ed isolare la frazione proteica ad attività ialuronidasica;

- d) sottoporre la frazione proteica ad attività ialuronidasica ottenuta al passaggio c) a cromatografia a scambio anionico forte ed isolare la frazione proteica ad attività ialuronidasica.
- 5 4) Ialuronidasi secondo la rivendicazione 1 o 2 come medicamento.
- 5) Uso della ialuronidasi secondo la rivendicazione 1 o 2 per la preparazione di composizioni farmaceutiche o veterinarie destinate al trattamento di patologie
- 10 in cui sia necessario o vantaggioso degradare l'acido ialuronico presente nei tessuti o organi affetti da dette patologie.
- 6) Uso secondo la rivendicazione 5 in cui la composizione è una composizione farmaceutica e la
- 15 patologia è scelta fra edemi, stati infiammatori, geloni, tumori solidi, malattie allergiche mediate da IgE, patologie del cavo orale ed emorragie vitreali spontanee.
- 7) Uso secondo la rivendicazione 5 in cui la
- 20 composizione è una composizione veterinaria e la malattia è mastite bovina.
- 8) Composizioni farmaceutiche o veterinarie contenenti la ialuronidasi della rivendicazione 1 o 2 in miscela con opportuni eccipienti e/o veicoli.
- 25 9) Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 8 in forma di preparazioni iniettabili

o di preparazioni topiche per applicazione epidermica, transdermica o oftalmica.

10) Composizioni secondo la rivendicazione 8 o 9
contenenti inoltre uno o più principi attivi scelti
5 fra: antinfiammatori steroidei e non-steroidi,
antitumorali, allergeni, anestetici locali,
antibiotici, anticorpi monoclonali, citochine, enzimi
ed acido ialuronico solfato.

11) Composizioni secondo la rivendicazione 10) in cui
10 il principio attivo è acido ialuronico solfato e la
composizione topica per applicazione dermica è in
forma di crema, gel, unguento o soluzione per
nebulizzazione.

12) Uso della ialuronidasi secondo la rivendicazione
15 1 o 2 come reagente in saggi biochimici per la
determinazione qualitativa/quantitativa dell'acido
ialuronico.

CLAIMS

- 1) Hyaluronidase from *Streptomyces koganeiensis*
5 ATCC 31394 comprising the N-terminal amino acid
sequence shown in SEQ ID No. 1
- 2) Hyaluronidase according to claim 1 having a
molecular weight of 21,6 kDa, an isoelectric point
(pI) ranging from 4.4 to 4.8 and an enzymatic
10 activity of 40,000 I.U./mg.
- 3) A process for the preparation of the hyaluronidase
according to claim 1 or 2 comprising the following
steps:
 - a) submitting the supernatant obtained from the
15 fermentation of *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394
to weak cationic exchange chromatography and
isolating the protein fraction with hyaluronidase
activity;
 - b) submitting the protein fraction with hyaluronidase
20 activity from step a) to diafiltration and strong
anionic exchange chromatography and isolating the
protein fraction with hyaluronidase activity;
 - c) submitting the protein fraction with
hyaluronidase activity from step b) to strong
25 cationic exchange chromatography and isolating the
protein fraction with hyaluronidase activity;

d) submitting the protein fraction with hyaluronidase activity from step c) to strong anionic exchange chromatography and isolating the protein fraction with hyaluronidase activity.

5 4) The hyaluronidase according to claim 1 or 2 as medicament.

5) Use of the hyaluronidase according to claim 1 or 2 for the preparation of pharmaceutical or veterinary compositions for the treatment of diseases in which
10 degradation of hyaluronic acid in the affected tissues or organs is advantageous or desirable.

6) The use according to claim 5 wherein the composition is a pharmaceutical composition and the disease is selected from edema, inflammation,
15 chilblain, solid tumors, IgE-mediated allergies, oral diseases and spontaneous vitreous haemorrhages.

7) The use according to claim 5 wherein the composition is a veterinary composition and the disease is bovine mastitis.

20 8) Pharmaceutical or veterinary compositions containing the hyaluronidase of claim 1 or 2 admixture with suitable excipients and/or carriers.

9) The compositions according to claim 8 in the form of injectable preparations or of topical preparations
25 for epidermal, transdermal or ophthalmic application.

10) The compositions according to claim 8 or 9 further containing one or more active principles selected from: steroidal and non-steroidal antinflammatories, antitumor agents, allergens, local
5 anesthetics, antibiotics, monoclonal antibodies, cytokines, enzymes and sulphated hyaluronic acid.

11) The compositions according to claim 10) in which the active principle is sulphated hyaluronic acid and the topical composition for epidermal application is
10 in the form of cream, gel, ointment or spray.

12) Use of the hyaluronidase according to claim 1 or 2 as a reagent in biochemical assays for the quali/quantitative determination of hyaluronic acid.

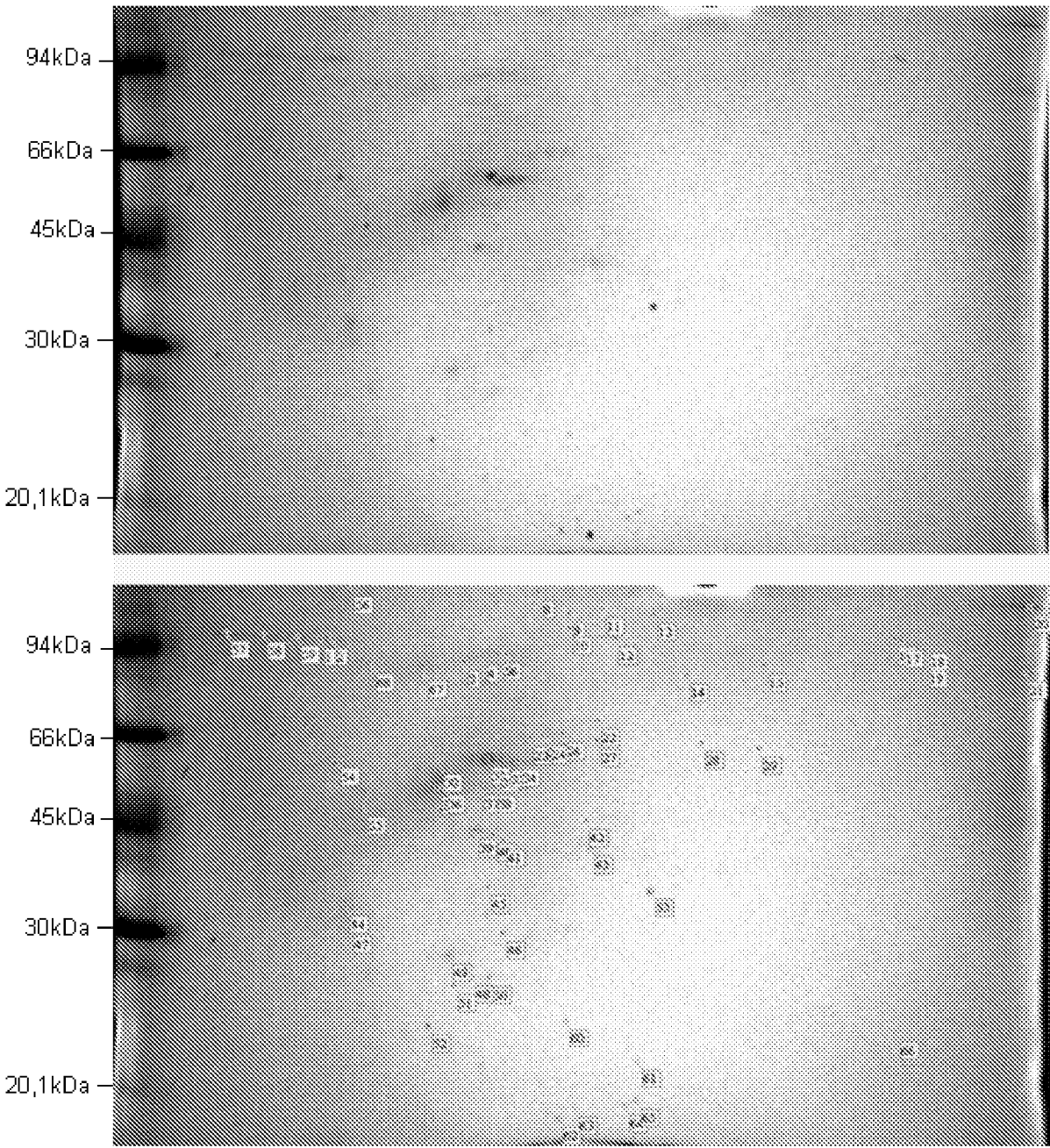


FIG. 2

2/9

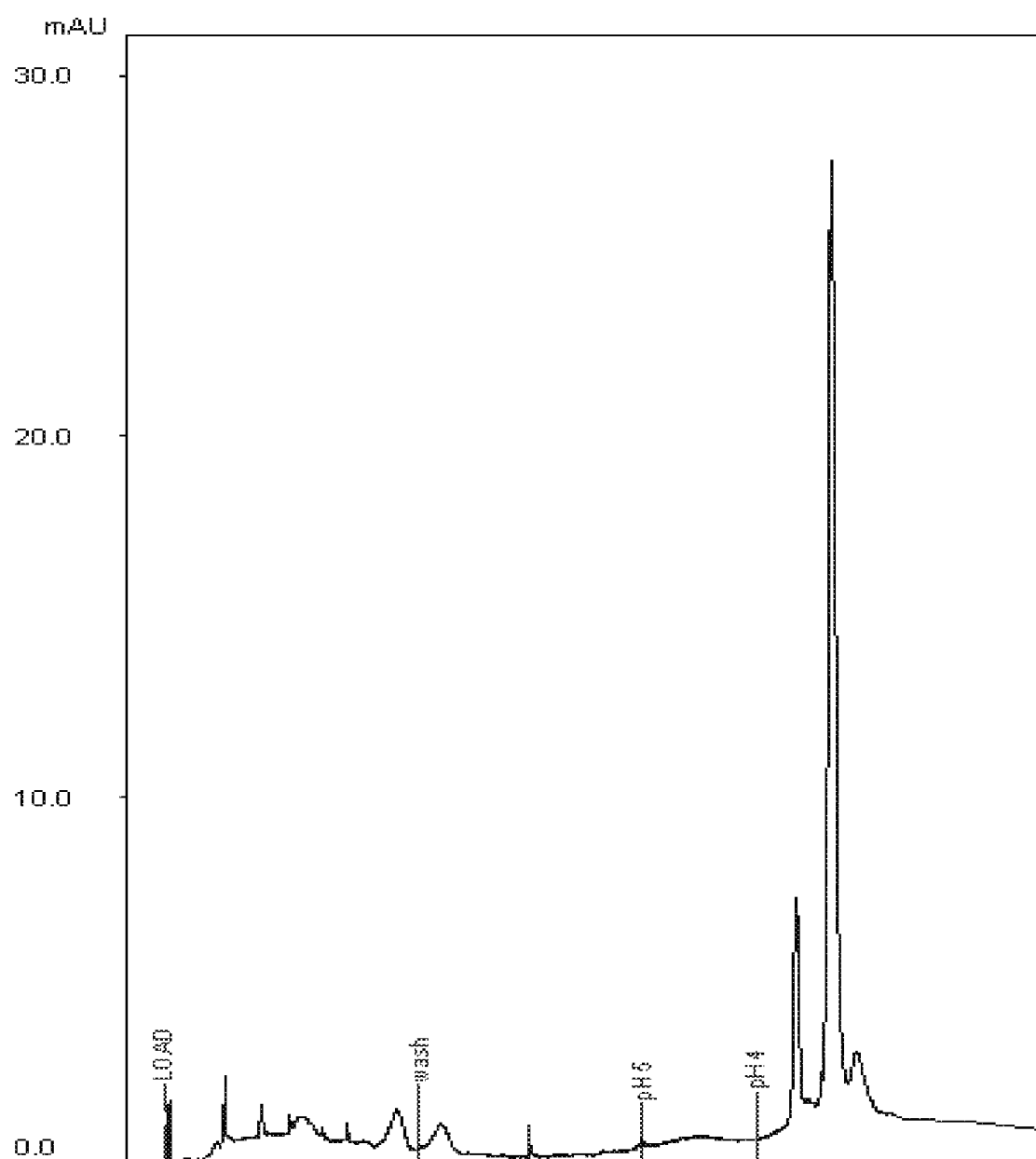


FIG. 3

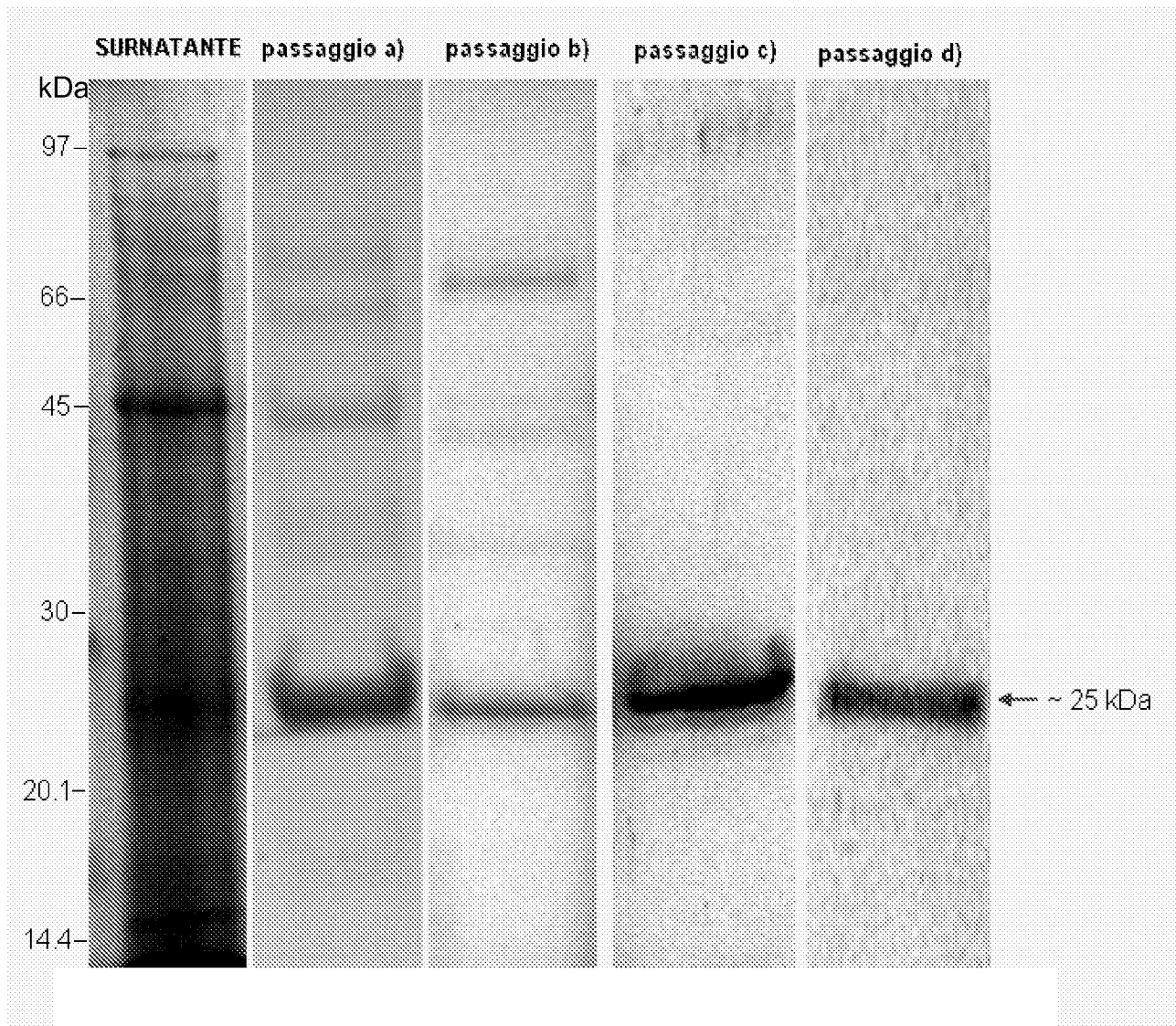


FIG. 4

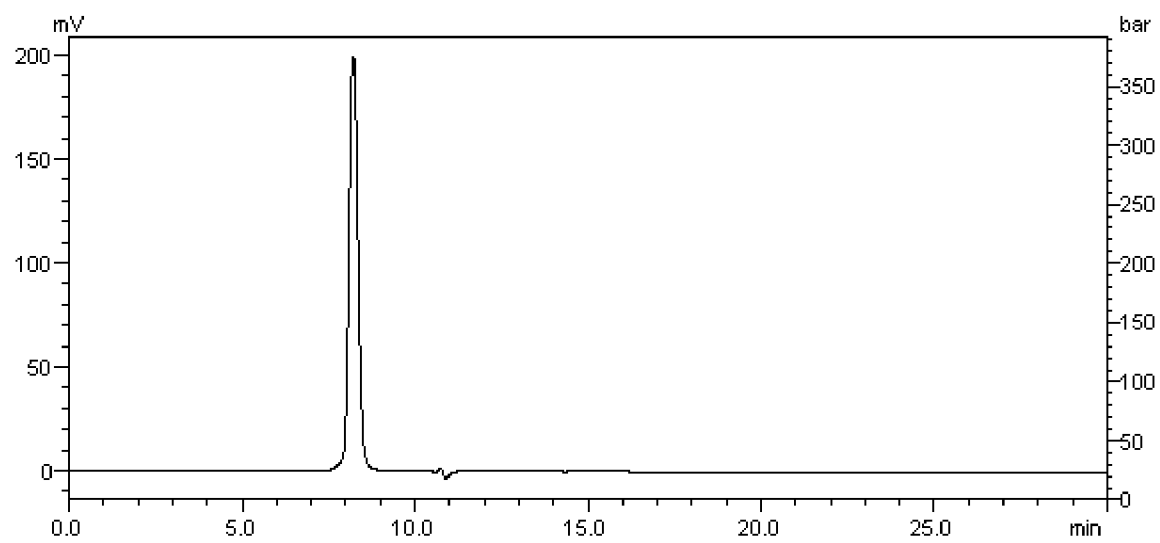


FIG. 5

5/9

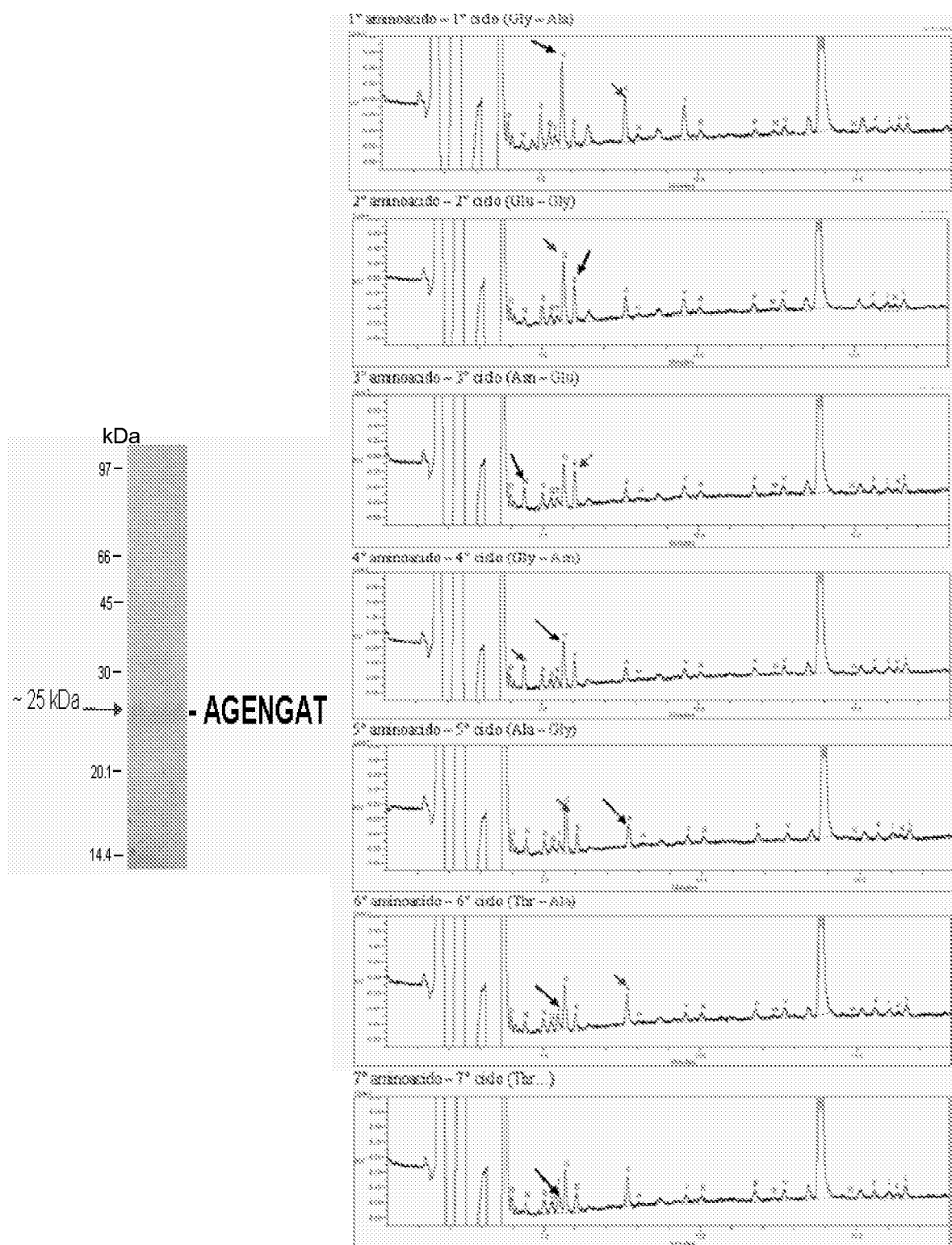


FIG. 6

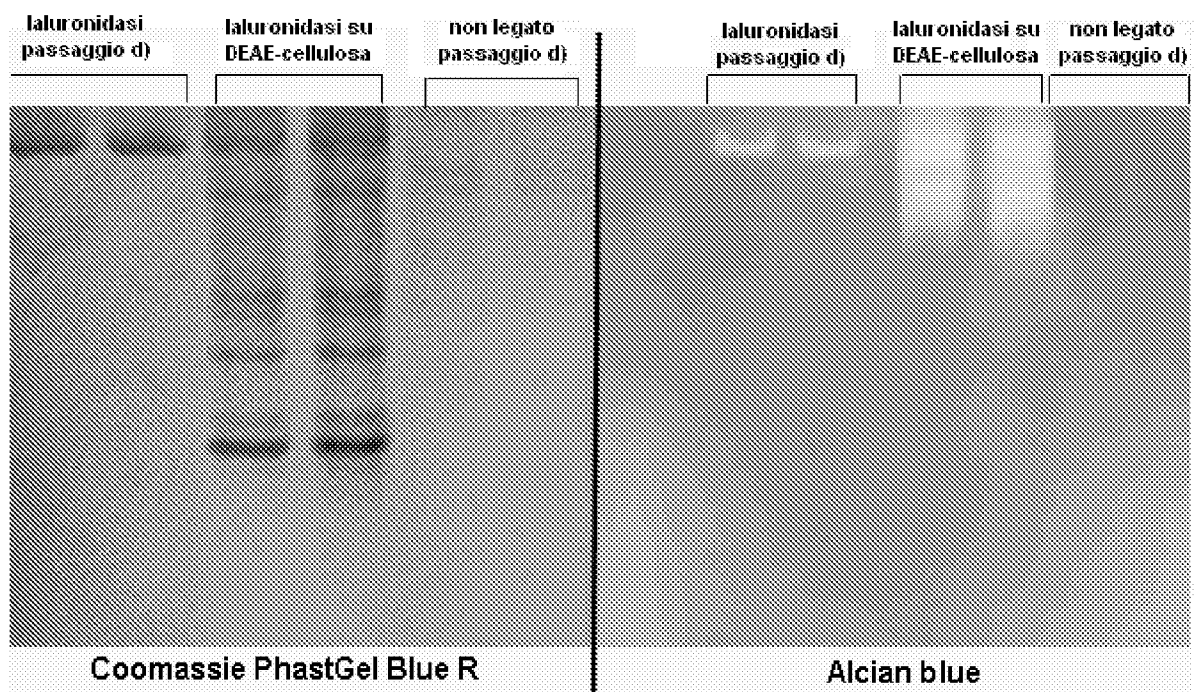
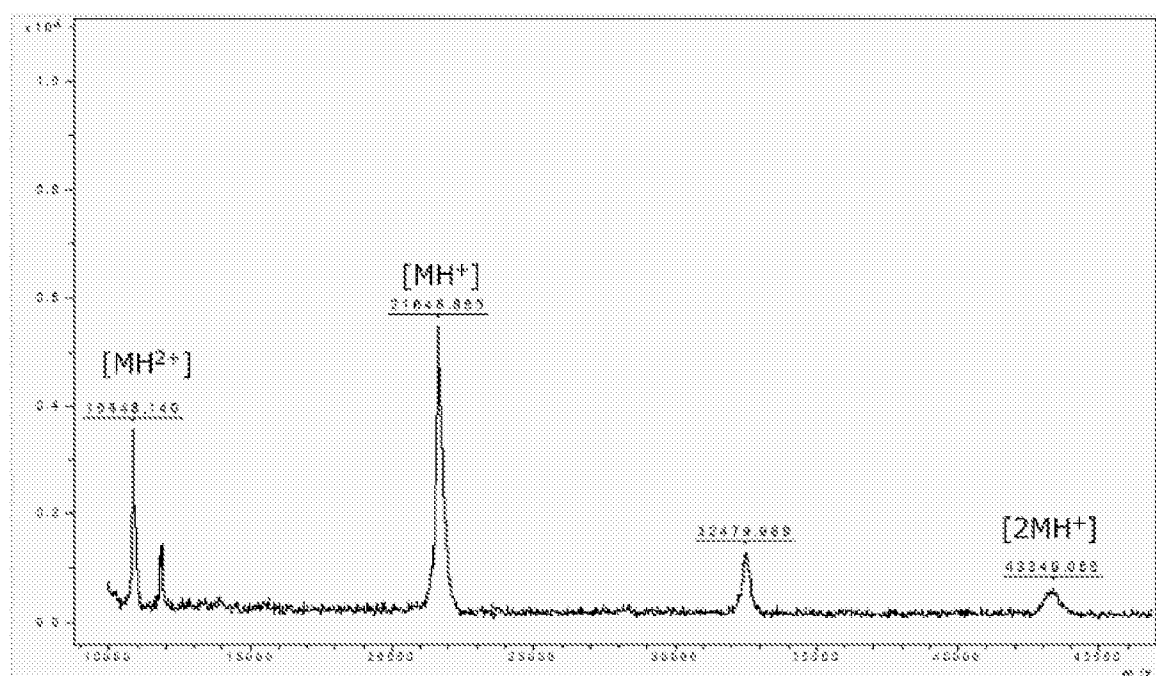


FIG. 7

7/9



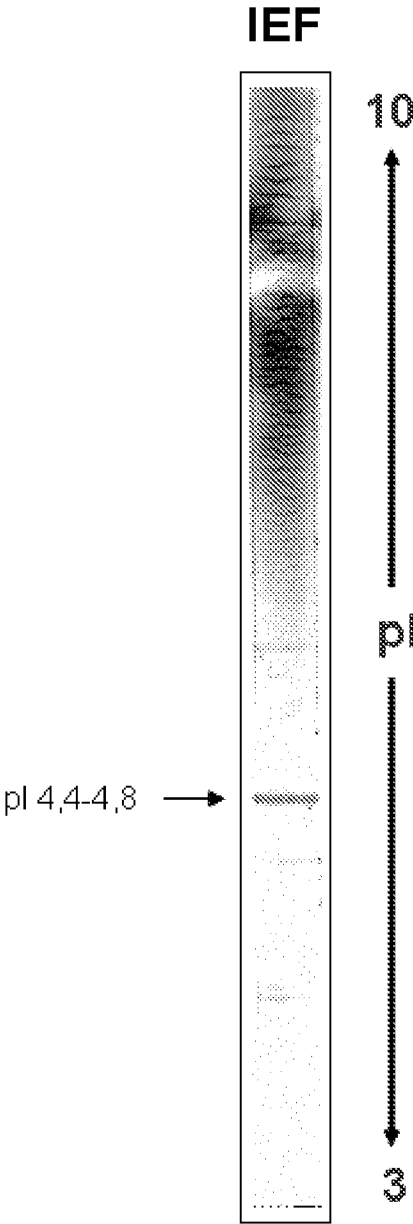


FIG. 9

