



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101993900314925
Data Deposito	30/07/1993
Data Pubblicazione	30/01/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PROCESSO PER LA PREPARAZIONE E PURIFICAZIONE DI ACIDO IALURONICO AD ALTO PESO MOLECOLARE

- 1 -

67

Descrizione di una invenzione industriale dal titolo "Processo per la preparazione e purificazione di acido ialuronico ad alto peso molecolare" della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via De' Carpenteri 3, Brindisi, Italia, nella persona del suo Presidente e Legale Rappresentante, Avv. Ennio Arengi.

Inventori designati: Flavia CAZZOLA, Michael O'REGAN

Depositata il 30-4-93 con N. **PD 93 A 0 0 0 1 6 4**

*** **

OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a un metodo per la produzione di acido ialuronico sale sodico ad alto peso molecolare mediante tecniche fermentative, utilizzando un ceppo di Streptococcus equi di gruppo C (secondo la classificazione di Lancefield) e un terreno di coltura semidefinito che consente di ottenere un notevole contenimento dei costi. Inoltre si riferisce a un metodo per estrarre e purificare l'acido ialuronico prodotto e rilasciato nel medium di coltura ed al suo utilizzo come modulatore nel controllo del processo di cicatrizzazione.

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'acido ialuronico (HA) è un glicosaminoglicano altamente viscoso costituito da unità ripetitive alternate di acido glucuronico e N-acetil-glucosamina unite da legami B1-3 e B1-4 glicosidici. L'acido ialuronico è presente in diversi tessuti connettivi animali come la pelle e la cartilagine, nel cordone ombelicale, nel liquido sinoviale, nell'umor acqueo e nella cresta di gallo. Il



Ennio Arengi

67

- 2 -

ruolo dell'acido ialuronico nella pelle e nella cartilagine è quello di trattenere l'acqua e di conferire elasticità e tonicità a tali tessuti mentre nei fluidi articolari ha un'azione lubrificante e protegge le cellule da shocks fisici esterni o da infezioni batteriche. Data la sua natura altamente idrofila, l'acido ialuronico risulta essere un costituente ideale nella preparazione di lozioni cosmetiche, soluzioni altamente purificate di HA vengono inoltre utilizzate come medium di supporto nella chirurgia dell'occhio U.S. Pat. No. 4,141,973 di E.A. Balazs (1979) oppure come fluido sostitutivo nelle articolazioni in presenza di particolari condizioni patologiche. L'ottenimento di acido ialuronico ad alto peso molecolare, avente quindi maggiori proprietà viscoelastiche, appare pertanto di notevole interesse soprattutto quando si considera la necessità di assorbire grosse variazioni di pressione, quali ad esempio quelle che si verificano "in vivo" nei giunti articolari.

L'estrazione di acido ialuronico da fonti animali presenta numerosi svantaggi legati alla limitata disponibilità di materia prima, alla difficoltà di estrarre quantità consistenti di acido ialuronico ad alto peso dai tessuti animali, dove l'acido ialuronico è presente solo in tracce e spesso sotto forma di complessi con proteine o altri mucopolisaccaridi, ed inoltre al pericolo di contaminazioni virali. Per questi motivi molti ricercatori si sono rivolti verso la produzione di HA da sorgenti microbiche. La produzione di HA da parte di streptococchi è stata dimostrata inizialmente da Forrest et al., J. Biol. Chem. 118, 61 (1937), e successivamente da altri ricercatori come Roseman et al., J. Biol. Chem. 203, 213 (1953); Pierce e White Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 50 (1954); U.S. Patent No. 2,975,104 di G.H. Warren; Sunghara et al. J. Biol. Chem. 254, 6252 (1979). Essi hanno dimostrato l'identità dell'acido



Amir Zogic

fy

- 3 -

ialuronico presente nella capsula di molti ceppi di streptococco di gruppo A e di gruppo C con quello proveniente da fonti animali. Questi microrganismi possono assimilare il glucosio o altre fonti di carbonio e, in particolari condizioni ambientali, produrre acido ialuronico come metabolita secondario. La sintesi di acido ialuronico da parte degli streptococchi è comunque influenzata da molti fattori genetici e nutrizionali. Gli streptococchi sono tra i batteri più esigenti dal punto di vista nutrizionale. La letteratura descrive molti terreni che favoriscono la produzione di acido ialuronico da parte di questi microrganismi che normalmente comprendono carboidrati, aminoacidi, vitamine, sali inorganici e alcuni fattori di crescita. In genere come fonte di carbonio viene utilizzato il glucosio, la fonte di azoto può essere invece sia organica che inorganica: peptone, estratto di lievito, idrolizzati di caseina, idrolizzati di soia, aminoacidi, solfato di ammonio, cloruro di ammonio, fosfato di ammonio, urea, glutammina ecc. Può inoltre essere aggiunto al terreno una certa varietà di sali inorganici utili per la crescita come solfati, idrocloruri, carbonati, nitrati, fosfati e acetati, ad esempio di calcio, potassio, sodio, magnesio, manganese, ferro, rame e zinco. Infine anche l'aggiunta di vitamine e aminoacidi può essere vantaggiosa per la crescita batterica.

Alcuni terreni nutritivi specifici per streptococchi sono già presenti in commercio come il Brain Heart Infusion e il Todd-Hewitt Broth. Altri sono stati descritti in precedenti brevetti sulla produzione di HA per via fermentativa, come ad esempio in U.S. Patent 4, 517, 295 di Bracke et al., U.S. Patent 2,975,104 di Warren et al., U.S. Patent 4,784,990 di Nimrod et al., European Patent 0,244,757 di Hosoya et al., U.S. Patent 4,897,349 di Swann et al.. Molti di questi terreni presentano però lo svantaggio di richiedere per la



Amir Lope

- 4 -

69

loro preparazione componenti costose e quindi non appaiono particolarmente vantaggiosi per applicazioni industriali. Da qui, la mancanza di competitività del prodotto ottenuto con questi terreni complessi rispetto a quello ottenuto da fonti animali. Un'altro problema legato alla produzione di acido ialuronico da fonti batteriche è l'utilizzo, che viene fatto in alcuni casi, di ceppi di streptococco patogeni per l'uomo come ad esempio S.pyogenes (U.S. Patent 4,517,295 - Bracke et al.)

Tuttavia la produzione di acido ialuronico per via fermentativa, oltre a permettere l'ottenimento di elevate quantità di polimero a più alto peso molecolare rispetto a quello ottenuto per estrazione dai tessuti animali, consente di utilizzare dei metodi di purificazione meno complessi. Le procedure note, che sono state descritte in numerosi brevetti, consentono l'isolamento di acido ialuronico ad alto peso molecolare spesso ad un buon livello di purificazione. Questi metodi però fanno spesso uso di elevate quantità di solventi o altri prodotti tossici, come ad esempio il cetilpiridinio cloruro, e richiedono perciò numerosi passaggi per poter ottenere un'acido ialuronico altamente purificato, caratteristica necessaria per l'utilizzazione del polimero in campo farmacologico. Tutto ciò comporta problemi di costi e problemi legati all'impatto ambientale.

Usi terapeutici dell'acido ialuronico (HA):

Le elevate caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità dell'acido ialuronico hanno determinato il suo utilizzo nel campo della viscochirurgia. L'acido ialuronico infatti, in una forma altamente polimerica, che raggiunge un peso molecolare di 4-6 milioni, è presente a diverse concentrazioni nella matrice del tessuto connettivo di tutti i primati ed il suo utilizzo nella



Amie 2016

- 5 -

GP

viscochirurgia rappresenta perciò solo un temporaneo aumento di concentrazione dell'acido ialuronico nativo.

Durante determinati interventi chirurgici, l'HA può fungere da tessuto protettore in grado di assorbire gli shock e lubrificare gli strati cellulari sensibili a danni meccanici causati da strumenti chirurgici o impianti. Esso rappresenta il medium in cui viene effettuato l'intervento, evita la formazione di aderenze tissutali e consente la rimozione di frammenti di tessuto o di coaguli di sangue. Oltre a questo effetto protettivo durante l'intervento, l'acido ialuronico, sotto forma di una vera e propria barriera molecolare, può essere utilizzato come impianto tra due superfici tissutali, che per esplicare la loro corretta funzione, devono essere mantenute separate. Un'altra applicazione dell'acido ialuronico è legata alla sua viscoelasticità. In alcune condizioni patologiche (ad esempio artrite ed artrosi cronica o acuta) si verifica una diminuzione della viscoelasticità di alcuni tessuti, caratterizzata da una diminuzione del peso molecolare, e della concentrazione dell'acido ialuronico endogeno. La "viscosupplementation" è il processo terapeutico attraverso il quale vengono ristabilite o aumentate le normali proprietà reologiche, introducendo nel compartimento tissutale un mezzo viscoso come l'acido ialuronico. In letteratura è stato ampiamente descritto anche il ruolo biologico dell'acido ialuronico nella riparazione tissutale. L'aggiunta di HA esogeno può avere un ruolo importante nell'accelerare o modificare la riparazione tissutale, facilitando il movimento di cellule infiammatorie, mesenchimali ed epiteliali nel sito di riparo tissutale. Il riparo tissutale consiste in una complessa serie di eventi che coinvolgono diversi tipi di cellule e che hanno come ultimo esito la formazione di una cicatrice. Proprio quest'ultima fase



Annie Ruffe

67

- 6 -

della riparazione, nonostante sia necessaria, rappresenta spesso un grosso problema a livello estetico. Appare perciò di notevole importanza essere in grado di ridurre la formazione della cicatrice.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Gli streptococchi di gruppo A e C secondo la classificazione di Lancefield producono una capsula di acido ialuronico la cui composizione è identica a quella del polimero presente nel tessuto connettivo dei mammiferi (Krause, R.M. 1972: "The streptococcal cell: relationship of structure to function and pathogenesis". p. 3-18; - L.W. Wannamaker and J.M. Matsen ed., "Streptococchi and streptococcal diseases". Academic Press. Inc., New York.). Esiste un'ampia varietà di streptococchi di gruppo A e C in grado di produrre elevate concentrazioni di HA. I microrganismi che possono essere usati nel processo relativo alla presente invenzione sono S. equi, S. zooepidemicus o S. equisimilis, appartenenti al gruppo C e quindi non patogeni per l'uomo. La specie preferita è comunque S. equi ed in particolare il ceppo di S. equi 68222 proveniente dall'Istituto Belfanti di Milano. Questo ceppo non è stato geneticamente ingegnerizzato pertanto non è soggetto agli svantaggi di instabilità caratteristici dei ceppi manipolati geneticamente.

S. equi 68222 produce acido ialuronico in condizioni di aerobiosi e quando viene utilizzato la fonte di carbonio è rappresentata da glucosio.

Il principale obiettivo della presente invenzione è quello di fornire un metodo per produrre acido ialuronico ad alto peso molecolare da fonti batteriche utilizzando un medium di coltura nuovo ed economicamente vantaggioso. Il nostro approccio è stato quello di sviluppare un terreno a basso costo che



Paolo Zappalà

tp

- 7 -

migliorasse il rapporto HA/cellula facilitando così la separazione dei batteri dal brodo di coltura e di conseguenza l'intero processo di purificazione.

Un'altro obiettivo è quello di fornire un metodo per l'isolamento e la purificazione dell'acido ialuronico rilasciato nel medium di coltura che consenta una buona resa, sia facilmente riproducibile, permetta di ottenere un prodotto terapeuticamente accettabile, faciliti un contenimento dei costi ed inoltre riduca i problemi legati all'impatto ambientale.

Infine un terzo obiettivo è quello di produrre un acido ialuronico ad alto peso molecolare che possa essere utilizzato nella modulazione della cicatrizzazione.

L'invenzione comprende un processo per la biosintesi di acido ialuronico che implica:

- la formulazione di un terreno di coltura liquido che favorisca la crescita del suddetto microrganismo e che sia conveniente dal punto di vista economico. Tale terreno è costituito da una miscela di due diverse fonti di azoto che favoriscono la crescita batterica e la produzione di HA ma che presentano un notevole contenimento nei costi; una fonte di azoto è rappresentata da idrolizzato di soia ad una concentrazione tra 10 e 30 g/L, e preferibilmente a 20 g/L, una seconda fonte di azoto può invece essere Yeast Extract o Polipeptone ad una concentrazione tra 5 e 15 g/l, e preferibilmente a 10 g/L. Questo terreno di coltura contiene anche una fonte di carbonio rappresentata da glucosio ad una concentrazione tra 10 e 60 g/L (la concentrazione ottimale sembra comunque essere 30 grammi/litro) e ad un pH tra 6.5 e 7.5;
- l'introduzione nel suddetto terreno di coltura di composti che agiscono come sequestranti di radicali liberi.



Luigi Zappè

g

- 8 -

- l'inoculo del terreno liquido di cui sopra con il ceppo di streptococco produttore di acido ialuronico;
- la coltivazione del microrganismo inoculato in condizioni di coltura aerobiche mediante introduzione di aria sterile nel terreno di coltura tra 0.1 e 4 vvm, e preferibilmente a 2 vvm, con vigorosa agitazione tra 200 e 900 rpm, e preferibilmente a 600 rpm;
- l'uccisione dei batteri, la separazione dei batteri dal terreno di coltura e l'isolamento da quest'ultimo dell'acido ialuronico prodotto.

Il processo qui descritto permette di ottenere acido ialuronico con un peso molecolare superiore a 2×10^6 D, con una resa intorno a 2 g/l, ottenuta mediante una fermentazione aerobica.

L'invenzione inoltre comprende un metodo per utilizzare l'acido ialuronico prodotto nella modulazione della cicatrizzazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

E' ormai noto che gli streptococchi sono, dal punto di vista nutrizionale, tra le specie batteriche più esigenti (Terleckyi B. et al. Infection and Immunity 649-655, 1975) (Milligan T. W. et al. J. of Clinical Microbiol. 28-33, 1978). In letteratura sono descritti diversi terreni di coltura che promuovono la crescita di questi microrganismi e la loro produzione di acido ialuronico. Tali terreni comprendono normalmente carboidrati, aminoacidi, vitamine e sali inorganici, oltre a diversi fattori di crescita. L'influenza della fonte di carbonio, della fonte di azoto e dei composti inorganici sulla crescita batterica e sul metabolismo è infatti molto importante per i microrganismi produttori di esopolisaccaridi (Robinson J.A. et al. Biotech. and Bioeng. vol XXVI,



Luigi Zappè

fy

- 9 -

1409-1417, 1984) (MacFarlane et al. J. of Applied Bacteriology 68, 179-187, 1990). Per quanto riguarda la fonte di carbonio più appropriata per la produzione di HA, quella maggiormente utilizzata è rappresentata dal glucosio. Infatti, oltre ad essere una fonte di energia per la crescita cellulare, esso è anche utilizzato per la sintesi dei singoli monomeri che costituiscono il polimero di HA. Le fonti di azoto invece possono essere diverse, organiche o inorganiche, e normalmente comprendono: estratto di lievito, peptone, idrolisati di caseina, proteine di soia, ammonio solfato, ammonio cloruro, ammonio fosfato ecc. Oltre a queste due componenti principali possono essere aggiunti al terreno di coltura dei sali inorganici, quali ad esempio solfati, carbonati, fosfati, cloruri di calcio, potassio, magnesio, sodio, manganese, zinco, ferro ecc., che favoriscono la crescita e talvolta possono intervenire come cofattori di enzimi coinvolti nella sintesi di acido ialuronico.

E' stato così sviluppato un terreno di coltura che consente di produrre acido ialuronico utilizzando S. equi 68222 e permette di ottenere un contenimento dei costi in vista di un trasferimento del processo su scala industriale. Tale terreno permette inoltre di ottenere un migliore rapporto acido ialuronico/cellule rispetto al rapporto che si ottiene coltivando S. equi 68222 su terreni commerciali come Brain Heart Infusion oppure su diversi tipi di terreni descritti in precedenti brevetti. Un elevato rapporto HA/cellule facilita la fase iniziale del processo di purificazione che consiste nella separazione delle cellule batteriche dal brodo di coltura contenente il polimero d'interesse.

ESEMPIO 1

E' stato preparato il seguente terreno semidefinito, denominato HYP:



Fidia

Sp

- 10 -

- Hy-soy 10 g/L
- Special peptone 10 g/L
- Glucosio 30 g/L

Le proporzioni sopra indicate sono riferite a un litro di acqua distillata. Il terreno, appena preparato, è stato sterilizzato in parte per filtrazione attraverso un filtro di 0.22 micron (glucosio) e in parte autoclavato alla temperatura di 121°C per 20 minuti (Hy-soy e polipeptone). Il pH del terreno è stato aggiustato al valore di circa 7.

La crescita e la produzione di HA da parte di S. equi 68222 nel suddetto terreno di coltura è stata paragonata con la crescita e la produzione di HA ottenuta sempre utilizzando lo stesso microrganismo, coltivato però in terreni diversi, o commerciali (BHI) o descritti in altri brevetti (Hosoya et al., European Patent Application N. 0244757, 1987), (Nimrod et al., U.S. Patent 4,784,990, 1985), (Myamory et al., European Patent Application N. 0266578, 1987).

Un'ansata di S. equi 68222 è stata inoculata in 100 ml di ciascuno dei diversi terreni, precedentemente sterilizzati, in beute Erlenmeyer da 250 ml. Le colture, tutte in doppio, sono state incubate per una notte a 37°C con un'agitazione di 200 rpm. Dopo aver misurato la densità ottica di ogni coltura a 600 nm, il contenuto di ogni beuta è stato diluito con terreno fresco fino ad una densità ottica di circa 0.1 in modo da ottenere un volume finale di 200 ml in beute da 1 litro. La crescita è stata effettuata a 37°C, con vigorosa agitazione (200 rpm), a pH 7. Quando, durante la fermentazione, il pH del medium usciva dal range appropriato, è stato possibile riportarlo al valore desiderato aggiungendo un'adeguata quantità di acidi o basi. Un reagente alcalino può essere



Luigi Zappi



- 11 -

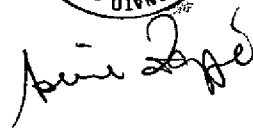
una soluzione acquosa di idrossido di sodio 1N, mentre un reagente acido può essere una soluzione acquosa di acido cloridrico 1N. Durante la fermentazione è stata sia seguita la crescita cellulare, mediante la lettura della densità ottica a 600 nm, sia monitorato il pH mediante il viraggio del rosso fenolo e mantenuto al valore di circa 7.

Alla fine della fermentazione, cioè quando i batteri raggiungevano la fase di crescita stazionaria, è stata misurata la crescita cellulare e la produzione di acido ialuronico. Nella tabella 1 sono riassunti i risultati. La quantità di acido ialuronico, prodotta fermentando S.equi 68222 in beute Erlenmeyer nel terreno HYP, appare paragonabile alla quantità ottenuta crescendo S.equi 68222 in BHI e in alcuni terreni descritti in precedenti brevetti, mentre la concentrazione cellulare è nettamente inferiore, da cui un miglior rapporto HA/cellule e una più facile separazione dei batteri dal brodo di coltura. La estrema semplicità di composizione e il costo delle fonti di azoto, complessivamente inferiore a quello delle fonti utilizzate nei terreni descritti in letteratura, rendono HYP economicamente vantaggioso e competitivo, soprattutto in vista di uno sviluppo di tipo industriale.

ESEMPIO 2

La modificazione dei parametri di coltura, in determinate condizioni sperimentali, consente di aumentare la produzione di polisaccaridi microbici. Attraverso l'uso di colture a batch o in continuo si possono esercitare diverse pressioni fisiologiche sulla crescita dei microrganismi e sulla sintesi di polisaccaridi.

E' stato valutato l'effetto di diverse concentrazioni di glucosio sulla crescita e



gf

- 12 -

sulla produzione di acido ialuronico. Utilizzando concentrazioni di glucosio di 60, 30, 15, 5, 0 g/L nel terreno di coltura, sono stati analizzati i seguenti parametri:

- consumo di glucosio;
- crescita cellulare;
- produzione di HA;
- efficienza di conversione del glucosio in HA;
- rapporto HA cellule.

Un'ansata di S. equi 68222 è stata risospesa in 200 ml di terreno di coltura in assenza di glucosio in beute Erlenmeyer da un litro. La coltura è stata posta in agitazione a 200 rpm a 37°C, overnight. Il giorno successivo tale coltura è stata utilizzata per inoculare 10 beute Erlenmeyer da 500 ml. Una certa quantità dell'inoculo è stato diluito con terreno fresco in modo da ottenere un valore di densità ottica di 0.1 e raggiungere un volume totale di 100 ml. Alle beute sono state aggiunte diverse concentrazioni di glucosio: 0 g/L, 5 g/L, 15 g/L, 30 g/L e 60 g/L. Ogni esperimento è stato effettuato in duplicato. Le 10 beute sono state quindi poste ad incubare a 37°C in agitazione (200 rpm). Durante la crescita sono stati monitorati ad intervalli di tempo regolari la densità ottica, il consumo di glucosio e la produzione di HA, mentre al termine della fermentazione è stato misurata la concentrazione cellulare in grammi di peso secco. Come appare dai risultati, riportati in tabella 2, la maggiore produzione di acido ialuronico si ottiene con 30 e 60 g/L di glucosio anche se con 60 g/L la crescita sembra essere leggermente più lenta, mentre la concentrazione cellulare allo stato stazionario è simile nei due casi. Diminuendo la concentrazione di glucosio nel medium si ha invece una una



Luigi Zappè

67

- 13 -

concomitante diminuzione della crescita e della produzione di HA. Una concentrazione di glucosio intorno a 30 g/L sembra quindi essere ottimale per la produzione di HA da parte di S. equi 68222.

E' stato inoltre valutato l'effetto dell'ossigenazione sulla crescita batterica e sulla produzione di HA. Sono state preparate 8 beute Erlenmeyer da 1 litro contenenti, a due a due, rispettivamente 100 ml, 200 ml, 500 ml e 1 litro del terreno di coltura descritto nell'esempio 1. Tali beute sono state inoculate con una sospensione di S. equi 68222 cresciuta overnight a 37°C in agitazione (200 rpm). Le condizioni di coltura sono state mantenute costanti in tutte le beute: 37°C, pH 7, 200 rpm. Al raggiungimento dello stato stazionario sono stati valutati i seguenti parametri:

- densità ottica misurata a 600 nm;
- produzione di acido ialuronico.

Come si può vedere in tabella 3, l'aerazione sembra non avere una grossa influenza sulla crescita batterica mentre invece è molto importante una buona ossigenazione per poter ottenere un'elevata produzione di acido ialuronico. Probabilmente in presenza di una ridotta aerazione, tutto l'ossigeno disponibile viene utilizzato per la riproduzione cellulare più che per la sintesi del polimero.

In colture esposte a forte ossigenazione tuttavia si può verificare un'accumulo di radicali liberi (anioni superossido, perossido d'idrogeno, radicali idrossilici, ossigeno singoletto). Negli ultimi anni è stata suggerita la possibilità che questi radicali liberi siano coinvolti nella degradazione dell'acido ialuronico. (Robert et al. Treatment of cartilage proteoglycan aggregate with H₂O₂, Biochem. J., 247, 349-357 (1987). Successivamente è



Amé Zaje

bf

- 14 -

stato dimostrato che, in vivo, le catene polimeriche di acido ialuronico sono facilmente degradabili sia per effetto di fattori fisici che di fattori chimici come radiazioni e agenti ossidanti ed enzimatici (Merry, P. et al. Annals of the Rheumatic Diseases, (1989), 48, 864-870; Greenwald, R.A., Seminars of Arthritis and Rheumatism, (1991), 20, 219-240). Altri studi hanno dimostrato che l'acido ialuronico viene depolimerizzato dall'azione dei radicali liberi mediante un meccanismo di rottura ossidativa del legame glicosidico.

E' stato così valutato l'effetto di una categoria di molecole, che presentano caratteristiche antiossidanti, sull'azione dei radicali liberi e di conseguenza sulla depolimerizzazione dell'acido ialuronico.

Tra le molecole che hanno la capacità di catturare specie radicaliche reattive ci sono dei composti che hanno almeno un anello aromatico a cui sono attaccati uno o più gruppi idrossilici. Questi composti includono ad esempio l'acido 2,3-diidrossibenzoico, l'acido salicilico, la vanillina, l'acido tannico ecc.

Sono state preparate 10 beute da 1 litro contenenti 200 ml di terreno di coltura, a due di esse sono stati aggiunti 0.11 gr/L di acido 2,3-diidrossibenzoico, alle altre rispettivamente acido salicilico, vanillina e acido tannico alla stessa concentrazione. Le ultime due beute sono state invece usate come controllo in quanto contenenti solo terreno di coltura senza l'aggiunta di molecole antiossidanti. Tali beute sono state inoculate con una sospensione di S. equi 68222, cresciuta overnight a 37°C, in agitazione (200 rpm), in modo da ottenere una densità ottica iniziale di 0.1. Le condizioni di coltura sono state mantenute costanti in tutte le beute, 37°C, pH 7, 200 rpm. Al raggiungimento dello stato stazionario la fermentazione è stata bloccata, l'acido ialuronico è stato purificato ed è stato misurato il peso molecolare con tecnica GPC-LALLS.



pure 2020

bf

- 15 -

Dai risultati ottenuti, descritti in tabella 4, è stato evidenziato che molecole che agiscono come sequestranti dei radicali liberi, possono essere impiegate vantaggiosamente per proteggere l'HA batterico dalla degradazione di tipo radicalico, preservandone l'alto peso molecolare e ottimizzando quindi le loro applicazioni nei diversi settori.

ESEMPIO 3

S.equi 68222 è stato coltivato in fermentatori agitati, aventi una capacità da 3 e 10 litri, utilizzando il terreno di coltura descritto nell'esempio 1. Dal momento che la concentrazione di ossigeno nel terreno controlla la sintesi di acido ialuronico, come descritto nell'esempio 2, la fermentazione è stata condotta in condizioni di aerobiosi in modo da mantenere la concentrazione di ossigeno disciolto nel terreno intorno al 20% di saturazione. La temperatura di fermentazione è stata mantenuta a 37°C e il pH al valore di 7, mediante l'aggiunta di idrossido di sodio 0.1 N. La formazione di schiuma è stata controllata aggiungendo al terreno di coltura un opportuno agente antischiuma non tossico, come ad esempio il silicone antischiuma 1520 (EU) della Dow Corning. La durata della fermentazione è stata di circa 12 ore, quando veniva utilizzato un inoculo batterico pari al 10% (v/v) rispetto al volume del medium. Al termine della fermentazione la densità della biomassa era equivalente a una torbidità di 8-12 unità di densità ottica misurate a 660 nm. In queste condizioni si è ottenuta una resa in termini di acido ialuronico prodotto di circa 1,5-2 g L⁻¹.

ESEMPIO 4



fine

68

- 16 -

Finora sono state usate tecniche diverse per purificare acido ialuronico ad alto peso molecolare dal brodo di fermentazione. Queste tecniche comprendono trattamenti con acido tricloroacetico o con una miscela di alcool isoamilico e cloroformio, l'utilizzo di enzimi proteolitici, precipitazioni in etanolo o acetone e precipitazioni selettive di acido ialuronico con cetil-piridinio cloruro. Tali metodi convenzionali usati per isolare e purificare l'acido ialuronico non sono comunque vantaggiosi per applicazioni industriali a causa dell'elevato numero di passaggi, talvolta complicati, dell'alto costo e della tossicità dei reagenti utilizzati. Il metodo descritto nella presente invenzione permette di ottenere acido ialuronico con peso molecolare superiore a 2×10^6 D con elevato livello di purezza, utilizzando un sistema semplice che non richiede l'uso di reagenti tossici e particolarmente vantaggioso dal punto di vista economico.

Al termine della fermentazione le cellule vengono uccise mediante trattamento con agenti battericidi. Possono essere usati agenti alchilanti come formaldeide, che, se usata in soluzione acquosa al 37%, viene denominata formalina, oppure alcuni alcoli come l'alcool etilico, l'alcool isopropilico o anche solventi organici come cloroformio o acetone. Normalmente questi composti vengono usati alla concentrazione di 1% v/v.

Per facilitare il rilascio dell'acido ialuronico eventualmente ancora attaccato alla capsula batterica, contemporaneamente all'agente battericida si può aggiungere un'adeguata concentrazione, tra 0.02 e 0.04 % w/v, di un surfattante anionico come sodio dodecil-solfato.

La massa batterica viene lasciata in contatto per una notte a temperatura ambiente con i suddetti reagenti e successivamente si procede alla separazione



Autore 20/10/1978



- 17 -

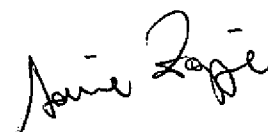
delle cellule batteriche dal brodo di coltura contenente il polimero di interesse. L'estrazione delle cellule dal brodo di coltura viene effettuata mediante una prefiltrazione con cartucce filtranti che presentano una porosità da 0 a 10 micron (particolarmente appropriate per questo uso sono le cartucce filtranti Millipore CP15-CP20).

Questa soluzione di acido ialuronico parzialmente libera da cellule batteriche viene successivamente purificata mediante microfiltrazione. Per eliminare in maniera definitiva le cellule batteriche dal brodo di coltura si può utilizzare una filtrazione a flusso tangenziale con membrane che presentano una porosità di 0.45 micron. La soluzione così ottenuta viene poi liberata da impurità derivate da componenti del terreno nutritivo, da prodotti di degradazione delle cellule batteriche, da residui del battericida usato o dell'agente surfattante tramite dialisi contro acqua distillata e apirogena. Per questa fase è necessario usare una membrana di ultrafiltrazione con un cut off di 200.000 Daltons; in questa fase la soluzione filtrata viene dializzata contro diversi volumi di acqua, normalmente da 10 a 50. Il filtrato è continuamente scaricato. Al termine della filtrazione la soluzione concentrata viene liofilizzata. L'acido ialuronico così ottenuto presenta un peso molecolare tra 2 e 3×10^6 Daltons come misurato mediante tecnica GPC LALLS. Il prodotto purificato è stato inoltre analizzato per determinare il contenuto proteico, la presenza di acidi nucleici e di pirogeni.

ESEMPIO 5

L'utilizzo dell'acido ialuronico ad alto peso molecolare nella modulazione della cicatrizzazione.

La formazione della cicatrice è una parte essenziale ed integrante del processo



by

- 18 -

di riparazione tissutale. Il tessuto cicatriziale conferisce una certa elasticità al sito della ferita permettendo così al nuovo tessuto formato di resistere agli stress imposti durante i normali movimenti del corpo. La deposizione del tessuto cicatriziale è essenzialmente dovuta alla proliferazione e alla produzione di collagene da parte di alcune cellule (in particolare fibroblasti) che migrano nel sito della ferita. Tuttavia come accade in molti processi biologici, anche la riparazione tissutale può talvolta divenire dannosa o incontrollata, provocando così delle serie conseguenze. In alcuni casi, per esempio nel caso di ferite ipertrofiche e cheloidi, i fibroblasti possono divenire iperstimolati con conseguente iperproduzione di tessuto di granulazione. La composizione di questo tessuto di granulazione può anche presentare un alterato rapporto tra il collagene di tipo 1 e di tipo 3. Inoltre i fibroblasti possono produrre un eccesso di α -actina e conseguentemente causare una severa contrazione del tessuto di granulazione. Tutto ciò ha come risultato la formazione di una cicatrice in rilievo nel caso di cicatrici ipertrofiche e la formazione di una cicatrice cronica non perfettamente rimarginata nel caso di cheloidi.

Un approccio per modificare le situazioni anomale precedentemente descritte potrebbe essere l'applicazione, nel sito della ferita, di agenti in grado di reprimere la proliferazione dei fibroblasti e la formazione di α -actina. L'acido ialuronico ad alto peso molecolare, prodotto secondo il metodo descritto in questo brevetto, è stato testato per analizzare la sua capacità di modulare la proliferazione di cellule muscolari lisce di ratto coltivate in vitro e l'espressione dell' α -actina da parte di queste stesse cellule. Cellule muscolari lisce di aorta di ratto sono state coltivate in Dulbecco's modified eagle's medium



Autore

bf

- 19 -

(DMEM). Le cellule sono state piastrate, in capsule di petri da 100 mm, ad una concentrazione di 5×10^3 cellule/cm². I prodotti da testare sono stati aggiunti alle piastre dopo 24 ore di coltura e le cellule mantenute in coltura per altri 7 giorni. Il numero di cellule è stato determinato mediante una conta cellulare effettuata con un emocitometro. Il contenuto di α -actina liscia è stato determinato mediante SDS-PAGE e Immunoblotting. Le cellule sono state risospese in 0.4 M Tris HCl, pH 6.8 contenente 1% SDS, 1% ditiotreitolo, 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 1mM Na-p-tosyl-L-arginina metil estere, e bollite per 3 minuti. La concentrazione proteica è stata determinata secondo il metodo di Bradford (Anal. Biochem., 72:248,1976) e da 1 a 5 mg di ciascun campione è stato caricato su un gel di elettroforesi al 5-20%. Il Western Blot è stato fatto come precedentemente descritto (Skalli et al, J. Cell Biol., 103:2787, 1991). Le modificazioni dell'espressione dell'actina sono state valutate mediante densitometria a scansione dei blot.

I risultati sono mostrati nelle tabelle 5 - 6 - 7. La conta cellulare e i livelli di actina sono espressi come percentuale media rispetto alle condizioni di controllo. L'acido ialuronico con un peso molecolare di 2 milioni di Dalton inibisce la proliferazione cellulare e l'espressione dell' α -actina liscia in maniera dose dipendente. Questi risultati indicano che questo composto è un agente capace di modulare la proliferazione dei fibroblasti e l'attività contrattile in ferite ipertrofiche e cheloidi.

COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE

Le composizioni farmaceutiche contenenti una quantità efficace di acido ialuronico, preparato secondo la presente invenzione, da solo oppure in



Amleto

67

- 20 -

associazione ad uno o più principi attivi e a eccipienti farmacologicamente accettabili, possono essere vantaggiosamente impiegate per la riduzione della cicatrizzazione nei casi di formazione di cicatrici ipertrofiche o cheloidi.

Queste composizioni farmaceutiche possono essere adatte per una somministrazione per via topica, intra-articolare, oftalmica, sistemica e peritoneale. Per la via di somministrazione topica e intra-articolare possono essere quindi in forma di creme, gel, unguenti e pomate, bende e garze; per la via oftalmica in forma di collirio, lenti e fili di sutura. Quindi, nel sistemico, possono essere utilizzate forme farmaceutiche adatte ad una somministrazione endovenosa o intramuscolare, come fiale e flaconcini.

La dose da somministrare dipende dai bisogni individuali, dagli effetti desiderati e dalla via di somministrazione.



fine 20/98

TABELLA 1

TERRENO	O.D. (600 nm)	HA (g/L)	HA /cell
HYP	3,5	1,36	0,38
BHII	5,4	1	0,18
Brevetto N° 0,244,757	5,3	0,8	0,15
Brevetto N° 4,784,990	2,6	0,38	0,14
Brevetto N° 0,266,578	6	0,76	0,12

- 21 -




 Fidia Advanced Biopolymers Srl
 Via De' Carpenteri, 3 - BRINDISI
 Partita IVA 01510440744

TAB. 2

GLUC. INIZ. gr/L	GLUC. CONS. gr/L	O.D. FINALE	HA gr/L	CELLULE gr/L	HA/GLUC. CONS.	HA/CELLULE
60	46,6	5,7	1,2	2,9	0.026	0.6
30	23,22	6	1,2	3	0.052	0.4
15	15	5	0,79	2,6	0.053	0.304
5	5	2,35	0,41	1,2	0.082	0.341
0	0	0,386	0,16	0,35	-	0.457




Peri Daga

Sp

- 23 -

TAB. 3

Vol. medium/Vol. aria	O.D. finale	HA g/L
1:10	4,7	1
1: 5	4,6	0,9
1: 2	3,9	0,7
1: 1	4,5	0,6

TAB. 4

Inibitori della ialuronidasi	O.D. finale	HA g/L	PM 10 ⁶ Da (metodo Lalls)
KBS	4.8	1.2	2.56
KBS + Acido Tannico	3.75	0.9	3.1
KBS + Vanillina	5	1.2	2.65
KBS + Gentisic Acid	4.25	1	3.1
KBS + Acido Salicilico	4.25	1	3



Amie Topé

TABELLA 5

Effetto dell'acido ialuronico (HA) sulla proliferazione e sulla espressione di α -ML actina in cellule muscolari lisce di ratto coltivate *in vitro*.

Peso molecolare(kd)	Dose (mg/ml)	Proliferazione cellulare	Espressione di α -ML actina
< 750 kd	0.5	118	99
= 750 kd	0.5	102	101
> 750 kd	0.5	112	49
= 2×10^6 kd	0.5	95	57

I valori sono espressi come percentuale media rispetto alle condizioni di controllo (10% FCS)

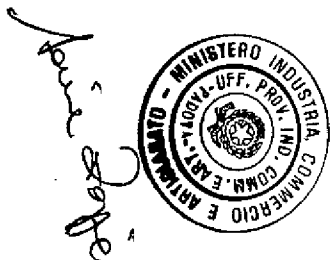


TABELLA 6

Effetto dell'acido ialuronico (HA) sulla proliferazione e sull'espressione di α -ML actina in cellule muscolari lisce di ratto coltivate *in vitro*.

Peso Molecolare (kd)	Dose (mg/ml)	Proliferazione cellulare	Espressione di α -ML actina
< 750 kd	2	107	40
= 750 kd	2	95	45
> 750 kd	2	88	50
= 2×10^6 kd	2	75	20

I valori sono espressi come percentuale media rispetto alle condizioni di controllo (10% FCS)

by



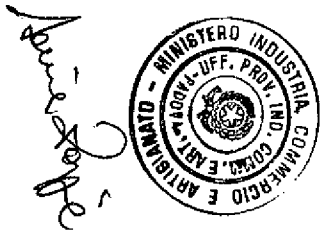
Perù
Doge

TABELLA 7

Effetto dell'acido ialuronico (HA) sulla proliferazione e sull'espressione di α -ML actina in cellule muscolari lisce di ratto coltivate *in vitro*.

Peso molecolare (kd)	Dose (mg/ml)	Proliferazione cellulare	Espressione di α -ML actina
< 750 kd	5	125	24
= 750 kd	5	82	46
> 750 kd	5	88	65
= 2×10^6 kd	5	65	18

I valori sono espressi come percentuale media rispetto alle condizioni di controllo (10% FCS)



by

Bj

- 27 -

RIVENDICAZIONI

- 1) Processo per la produzione di acido ialuronico che comprende le seguenti fasi:
 - la coltivazione di un ceppo batterico appartenente al genere Streptococco in grado di produrre acido ialuronico in un terreno semidefinito in presenza o assenza di molecole antiossidanti;
 - la purificazione dell'acido ialuronico con peso molecolare superiore a 2×10^6 D dal terreno di coltura semidefinito mediante un metodo che non prevede l'impiego di solventi organici;
- 2) Processo di cui alla rivendicazione 1, dove il ceppo appartenente al genere Streptococcus è Streptococcus equi.
- 3) Processo di cui alla rivendicazione 1, in cui il terreno di coltura comprende una fonte di carbonio e due fonti di azoto.
- 4) Processo di cui alla rivendicazione 3, in cui la fonte di carbonio è il glucosio.
- 5) Processo di cui alla rivendicazione 3, in cui le fonti di azoto sono idrolizzato di soia con estratto di lievito o polipeptone.
- 6) Processo di cui alle rivendicazioni da 1 a 5 per la produzione di acido ialuronico ad alto peso molecolare, caratterizzato dal fatto che la crescita del ceppo di Streptococcus equi avviene in un terreno contenente uno o più composti con caratteristiche antiossidanti.
- 7) Processo di cui alla rivendicazione 6 in cui i composti aventi caratteristiche antiossidanti hanno almeno un anello aromatico a cui sono legati uno o più gruppi idrossilici.
- 8) Processo di purificazione di acido ialuronico secondo la rivendicazione



Luigi Lopez

by

- 28 -

- 1, in cui la massa batterica viene eliminata mediante una prefiltrazione con cartucce filtranti che presentano una porosità da 0 a 10 micron e successivamente mediante una microfiltrazione a flusso tangenziale con membrane a porosità 0.45 micron.
- 9) Processo secondo la rivendicazione 8, in cui le impurità presenti nel brodo di coltura contenente l'acido ialuronico sono eliminate mediante dialisi con soluzione acquosa.
- 10) Processo secondo la rivendicazione 9, in cui la dialisi viene effettuata utilizzando una membrana da ultrafiltrazione con cut-off 200.000 D.
- 11) Processo secondo la rivendicazione 10, in cui la soluzione dializzata è concentrata tramite liofilizzazione.
- 12) Processo per la produzione di una frazione di acido ialuronico secondo le rivendicazioni da 1 a 11 avente un range di peso molecolare da 2×10^6 a 3×10^6 D.
- 13) Composizioni farmaceutiche comprendenti acido ialuronico secondo la rivendicazione 12, in associazione ad uno o più principi attivi ed eccipienti farmacologicamente accettabili.
- 14) Impiego di composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 13, in medicina.
- 15) Impiego secondo la rivendicazione 14, per la riduzione della cicatrizzazione nei casi di formazione di cicatrici ipertrofiche o cheloidi.
- 16) Metodo terapeutico per la somministrazione a livello topico, intra-articolare, oftalmico, sistemico e peritoneale di una quantità efficace di acido ialuronico secondo la rivendicazione 12 in associazione ad uno o



fine 2012

Fidia Advanced Biopolymers Srl
Via De' Carpenteri, 3 - BRINDISI
Partita IVA 01510440744

[Handwritten mark]

- 29 -

più principi attivi ed eccipienti farmacologicamente accettabili.

Fidia Advanced Biopolymers Srl

Il Presidente

***[Stamp]* Paolo Arangi**

[Handwritten signature]



[Handwritten signature]