

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 101**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2017 PCT/IB2017/054577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18020458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2017 E 17755571 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3491027**

54 Título: **Procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de ácido hialurónico**

30 Prioridad:

28.07.2016 IT 201600079633

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2021

73 Titular/es:

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT

72 Inventor/es:

PITTARELLO, MARA;
BORILE, FRANCESCO y
CORSA, VINCENZA

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 811 101 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de ácido hialurónico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de ácido hialurónico.

Campo de la invención

- 10 El ácido hialurónico (HA) es un polisacárido aniónico lineal de alto peso molecular, libre de grupos sulfato, que consiste en residuos alternos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina.

- El HA está presente en la naturaleza en geles pericelulares, en la sustancia fundamental del tejido conectivo de los organismos vertebrados (de los cuales representa uno de los componentes principales), en el líquido sinovial
15 de las articulaciones, en el humor vítreo y en el cordón umbilical.

Por lo tanto, el HA desempeña un papel importante en el organismo biológico, sobre todo como soporte mecánico de las células de numerosos tejidos, como la piel, los tendones, los músculos y el cartílago.

- 20 También se sabe que el HA, a través de sus receptores de membrana, en particular CD44, CD54 y CD168, modula muchos procedimientos diferentes relacionados con la fisiología y la biología de las células, como, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación celular y angiogénesis, y cuáles también ejercen otras funciones como la hidratación de los tejidos y la lubricación de las articulaciones. Es absolutamente biocompatible y, gracias a sus numerosas características especiales, se usa ampliamente en diversos campos, desde la
25 reparación de tejidos hasta la terapia viscosa adicional, desde la medicina dermoestética hasta la cirugía intraocular, desde el diseño de tejidos hasta la terapia celular y mucho más.

- Las características fisicoquímicas y biológicas de HA están fuertemente correlacionadas con su peso molecular (MW) que es extremadamente variable: generalmente se puede afirmar que el MW promedio en peso de HA
30 varía aproximadamente de 20.000 a 13×10^6 Da, y esta aproximación es necesaria ya que cambia radicalmente en relación con la fuente y el procedimiento de producción y purificación utilizado para aislarlo.

Existen fundamentalmente dos procedimientos principales para obtener HA:

- 35 producción de origen animal: históricamente, el HA se extrae de tejidos animales como el cordón umbilical, el humor vítreo o el líquido sinovial bovino y, sobre todo, las crestas de gallo. Su producción de origen animal tiene muchas limitaciones, es costosa, por ejemplo, ya que se necesitan numerosos pasajes para eliminar varios tipos de impurezas (comenzando desde la masa de residuos orgánicos después de la digestión del tejido de partida), por lo tanto, requiere pasajes que garanticen la inactivación y eliminación de
40 cualquier agente contaminante (como virus) posiblemente presente en el material de partida, requiere la disponibilidad de cantidades considerables de materia prima y no produce grandes rendimientos;

- fermentación de microorganismos: algunos microorganismos, en particular del género *Streptococcus* o *Pasteurella*, adecuadamente estimulados y/o modificados, son capaces de producir HA que se secreta en el
45 caldo de cultivo del cual se aísla a través de diversos procedimientos conocidos por personas expertas en el campo. También en este caso, se necesitan numerosos pasajes para eliminar las "impurezas" presentes, como, por ejemplo, los residuos de las paredes celulares de los microorganismos utilizados, iones metálicos, ácidos nucleicos y cualquier otro material proteico indeseado. A pesar de estas limitaciones, este es, hasta la fecha, el procedimiento de producción de HA más desarrollado y ampliamente utilizado. Se
50 están estudiando nuevos procedimientos para la producción de HA a través de la biotecnología, a través de la transfección de genes que expresan la enzima HA-sintasas en células huésped adecuadas, como algunos tipos de *Bacillus* (*Megaterium* y *Sibtilis*) y en *Escherichia coli*. Sin embargo, todos los procedimientos adecuados para eliminar cualquier residuo potencialmente dañino también son necesarios para estos procedimientos de producción.

- 55 En cualquier caso, independientemente del procedimiento utilizado, un pasaje clave en la producción de HA es obviamente la fase de extracción y purificación del polisacárido. Los procedimientos conocidos son numerosos y extremadamente articulados, obviamente modulados con respecto a las fuentes de partida para obtener HA. En primer lugar, los residuos de la fuente deben eliminarse, por consiguiente, para la extracción del tejido animal hay
60 fases de digestión de las proteínas y posteriores filtraciones, centrifugaciones y lavados; para la fermentación, normalmente se utilizan centrifugaciones y lavados progresivos. En cualquier caso, se obtiene una fracción líquida, a partir de la cual se aísla el polisacárido. A este respecto, el procedimiento más conocido y ciertamente más ampliamente aplicado, sobre todo para HA de origen animal, es la precipitación con solventes: en resumen, se usan concentraciones crecientes de solventes orgánicos (etanol, acetona) en la fracción líquida mencionada
65 anteriormente, que provocan la precipitación del ácido hialurónico, que luego se purifica por medio de

solubilizaciones y precipitaciones posteriores.

Un sistema alternativo prevé el uso de sales cuaternarias, cetilpiridinio o cetiltrimetilamonio con el objetivo de formar complejos del polisacárido y provocar su precipitación. Las solubilizaciones y precipitaciones posteriores son nuevamente necesarias antes de obtener el producto final.

El desarrollo de técnicas también ha combinado las etapas clave descritas anteriormente, para hacer que el procedimiento sea eficiente en términos de rendimiento y eficaz en términos de pureza: hasta la fecha, sin embargo, todavía hay numerosos eventos adversos, del orden de unos pocos cientos, reportados a las autoridades competentes (como la Agencia de Alimentos y Medicamentos de EE. UU., FDA) que surgieron especialmente después de la administración de composiciones farmacéuticas inyectables basadas en HA.

Este polisacárido se usa en una amplia variedad de campos y patologías: desde aplicaciones cosméticas (por administración tópica u oral) con una acción hidratante, hasta el uso dermocosmético tópico que tiene un efecto calmante, desde dispositivos de inyección para la corrección de defectos de la piel (intradérmicos) ya sea arrugas o cicatrices, hasta aplicaciones farmacológicas más estrictas, como el uso intraarticular en enfermedades óseas y articulares, o el uso intraocular como sustituto del humor vítreo, entre otros.

Mientras que para aplicaciones cosméticas, que no involucran tejidos dañados, un HA de grado cosmético (menos puro) es suficiente, sin embargo, es evidente que en el caso de aplicaciones farmacéuticas inyectables (especialmente en cavidades cerradas como la articulación y el ojo), es necesario un grado de pureza absoluta: la presencia de varios tipos de contaminantes, como ácidos nucleicos y/o proteínas y/o toxinas bacterianas residuales de las paredes celulares de grampositivos como el ácido lipoteicoico LTA (por ejemplo, del género *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*) o de gramnegativos como el lipopolisacárido LPS (como, por ejemplo, *Escherichia Coli*, *Pasteurella* y *Salmonella*), pueden causar una reacción inflamatoria significativa con la consiguiente liberación de citoquinas (en particular TNF e IL-1) tanto a nivel local como sistémico, lo que podría desencadenar una reacción inflamatoria generalizada con repercusiones en todo el organismo, alcanzando (en los casos más graves) formas de choque séptico, y esto explica los numerosos reportes de eventos adversos citados anteriormente. LTA y LPS, de hecho, son polímeros que consisten en una porción de lípidos y una porción de sacáridos capaz de causar respuestas inmunes fuertes y, en los casos más graves, artritis, nefritis, meningitis o fiebre y shock con consecuencias que incluso pueden ser fatales.

También debe tenerse en cuenta que, como se mencionó anteriormente, el MW de HA varía en relación con la fuente y el procedimiento de producción. Más específicamente, el MW al que se hace referencia en la presente memoria, se refiere al peso molecular promedio en peso medido con el procedimiento de "viscosidad intrínseca". La variabilidad del MW determina el uso de HA en diferentes campos: por ejemplo, los MW bajos se aplican en preparaciones dermatológicas o dermocosméticas (aproximadamente 200 kDa; Connectivine®), mientras que para aplicaciones intraarticulares, se prefieren pesos moleculares más altos (normalmente dentro del intervalo de 700-1800 kDa; Hyalgan®, Hyalubrix®, Orthovisc®) hasta MW de más de 1500 kDa utilizados en cirugía plástica o aplicaciones intraoculares. Es extremadamente importante calibrar perfectamente el MW del HA, no solo porque determina las características biológicas y fisicoquímicas del polímero, sino también porque se ha demostrado ampliamente que el HA que tiene un MW inferior a 30.000 Da tiene un fuerte efecto inflamatorio (EPO 138572), lo que es absolutamente indeseable, independientemente de la aplicación.

Esto significa que, en el procedimiento de producción y purificación de HA, se deben evaluar y controlar varios factores:

- el rendimiento del procedimiento: es fundamental extraer la máxima cantidad posible de HA de la fuente de producción seleccionada;
- la precisión del conjunto de las etapas de purificación: el producto obtenido debe estar libre de cualquier contaminante capaz de desencadenar procedimientos inflamatorios;
- el fraccionamiento del MW: se debe obtener el MW deseado y la certeza de haber eliminado las fracciones inflamatorias.

En el estado de la técnica, se conocen numerosos intentos de combinar estos requerimientos. Entre estos se pueden mencionar esquemáticamente los siguientes:

US 5925626: purificación de HA a partir de crestas de gallo por precipitación con etanol y formación de dos fracciones de MW (50-100 kDa y 500-730 kDa), libres de la fracción inflamatoria;

EP535200: purificación de HA a partir de crestas de gallo mediante salificación con aminos cuaternarios y posterior precipitación con solvente (etanol o acetona). Se obtiene un HA que tiene un MW que varía de 750 a 1230 kDa, libre de fracciones inflamatorias y destinado específicamente para uso oftálmico;

US 6489467: purificación de HA de *Streptococcus* por acidificación forzada usando HCl, con variaciones posteriores en el pH y diafiltraciones obteniendo HA que tiene un MW de aproximadamente 1700 kDa;

Choi et al. Biomaterials Research, 2014, 18, 1-10: purificación de HA de *Streptococcus zooepidemicus* por

diafiltración y precipitación con acetona. Se obtiene un HA con un MW que varía de 900 a 1100 kDa;
EP2870255: purificación de HA de *Streptococcus zooepidemicus* por filtración y ultrafiltración, variaciones de pH que alcanzan un MW que varía de 60 a 2400 kDa, y precipitación final con etanol.

5 Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación y purificación de una sal de sodio de HA que permite su producción con:

- 10 • **un grado de pureza muy alto** ya que está libre de contaminantes, y
- **un MW preciso y específico.**

El nuevo procedimiento de purificación del ácido hialurónico y su sal de sodio comprende varias etapas, articuladas y secuenciales, para la purificación de un HA preparado tal como es ampliamente conocido por personas expertas en el campo: tanto a partir de una fuente biológica, en particular de las crestas de aves del género *Gallus* (EP0138572, en lo sucesivo estas crestas serán indicadas como crestas de gallo, independientemente del género del ave) y también del procedimiento de fermentación del *Streptococcus*, también aplicable a un HA preparado con técnicas de ingeniería molecular de *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Megaterium* (EP 2614088, EP2614087); este procedimiento es preferentemente aplicable a un HA obtenido del caldo de fermentación de *Streptococcus*, incluso más preferentemente del caldo de *Streptococcus equi* subesp. *equi*, 68222, mutante H-1 (EP0716688). El Solicitante ha demostrado, como se explica a continuación, cómo este procedimiento permite la preparación no solo de una sal de sodio de HA de conformidad con todas las especificaciones fisicoquímicas requeridas por la Farmacopea Europea (monografía de HA: Ph. Eur., 5.0, 01/2005: 1472) pero, en particular, para algunas características de pureza, las especificaciones reivindicadas por el Solicitante han sido restringidas aún más, a fin de garantizar un ácido hialurónico que tenga un muy alto grado de pureza, que pueda ser utilizado con total seguridad, especialmente en todas las composiciones farmacéuticas inyectables (intraarticulares, intradérmicas e intraoculares) ya que está libre de cualquier componente proinflamatorio y pirogénico. La sal de sodio de HA purificada por medio del nuevo procedimiento objeto de la invención, también se puede usar en la preparación de todos los derivados conocidos por las personas expertas en el campo, tales como, por ejemplo, sus sales con metales pesados (EP 0827514), ésteres (EP 0216453), amidas (EP 1095064), sulfonatos (EP0940410) y productos reticulados, entre los que se encuentran los productos autorreticulados (EP0341745).

Un objeto de la invención también se refiere a fases particulares de tratamiento térmico de HA aún por purificar, en particular el caldo de fermentación de *Streptococcus* (que contiene este HA), con el fin de obtener **diferentes fracciones de HA que tengan un peso medio preciso MW**: el Solicitante, de hecho, ha perfeccionado el tratamiento térmico específico en términos de temperatura y tiempo de tratamiento (condiciones descritas en detalle a continuación) que siguen a la fase de inactivación del caldo de fermentación o que tienen lugar simultáneamente con la digestión enzimática de los crestas de gallo, que permiten que un producto final tenga la viscosidad intrínseca deseada, a obtener. Los valores promedio de MW en peso específicos de HA corresponden a valores específicos de la viscosidad intrínseca, y esta viscosidad se calcula de acuerdo con lo que está escrito en la monografía correspondiente de HA de la Farmacopea Europea de acuerdo con el procedimiento de "viscosidad intrínseca" (Ph. Eur. 5.0 01/2005: 1472).

Un objeto adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, cosméticas y nutricionales que contienen dichas fracciones, más específicamente:

- composiciones farmacéuticas para uso intraarticular que contienen sal de sodio de HA con un MW promedio en peso muy alto/alto/medio para su uso en la visco-suplementación de articulaciones artríticas, en daño articular traumático, en daño subcondral;
- composiciones farmacéuticas para uso intraocular o para administración ocular para el tratamiento de enfermedades oculares, que contienen sal de sodio de HA con un MW promedio en peso muy alto/alto/medio/bajo;
- composiciones farmacéuticas que contienen sal de sodio de HA con un MW promedio en peso muy alto/alto/medio/bajo para su uso en la prevención de adherencias posquirúrgicas;
- composiciones farmacéuticas para uso tópico o inyectable (intradérmico y/o intramuscular) que contienen sal de sodio de HA con un MW promedio en peso muy alto/alto/medio/bajo, preferentemente sal de sodio de HA con un MW promedio en peso medio/bajo, en el tratamiento de úlceras cutáneas, llagas, quemaduras, cicatrices y lesiones cutáneas, en el tratamiento de queloides o cicatrices hipo/hipertróficas, por lo tanto, en el tratamiento de todo tipo de defectos cutáneos con piel intacta o dañada, y como terapia para el tratamiento de enfermedades cutáneas tales como eczemas y varios tipos de dermatitis, en particular dermatitis atópica y sarpullido del pañal, psoriasis;
- composiciones farmacéuticas para uso intravesical que contienen sal de sodio de HA con un MW promedio en peso muy alto/alto/medio, en particular para el tratamiento de la cistitis intersticial;
- composiciones farmacéuticas para uso inyectable que contienen sal de sodio de HA con un MW promedio

en peso muy alto/alto/medio como material de carga en el campo dermoestético o como modelado corporal en cirugía plástica;

- composiciones cosméticas para uso tópico y oral;
- composiciones farmacéuticas o nutricionales que contienen sal de sodio de HA con un MW promedio en peso muy alto/alto/medio/bajo para el tratamiento oral o las articulaciones artríticas, para el trofismo tendinoso, el trofismo cutáneo y la membrana mucosa gastrointestinal.

Un objeto adicional de la invención también se refiere a biomateriales bi- o tridimensionales que comprenden derivados preparados con HA purificado de acuerdo con la invención, en forma de almohadillas, telas tejidas y no tejidas, granulados, películas y geles, también en posible asociación con células de diversos orígenes y/o componentes sanguíneos, tales como, por ejemplo, derivados de plaquetas. El Solicitante ha perfeccionado el siguiente procedimiento de purificación con el objetivo principal de eliminar todas las impurezas derivadas de la fuente de producción seleccionada de ácido hialurónico, representada principalmente por proteínas, ácidos nucleicos y/o por otros/varios tipos de pirógenos. En particular, el objetivo de la presente invención es la eliminación completa de las toxinas bacterianas derivadas de bacterias grampositivas como *Streptococcus* o *Bacillus* (o de bacterias como, por ejemplo, Enterococos y Estafilococos) o de bacterias gramnegativas como, por ejemplo, *Escherichia Coli* (o *Pasteurella* y *Salmonella*) normalmente ausentes en los caldos de fermentación (si no son residuales de la cepa origen) pero cuya posible contaminación representaría un problema de seguridad muy importante: la presencia de toxinas (como LTA o LPS) en HA ya que el producto final lo privaría de la pureza necesaria requerida, ya que puede determinar la producción de factores altamente proinflamatorios que podrían causar inflamación/infección de las articulaciones o tejidos tratados, incluso hasta su destrucción total o necrosis.

El nuevo procedimiento de purificación de la sal de sodio de HA garantiza:

- un alto rendimiento del procedimiento,
- pureza total del producto,
- producción de la fracción con la viscosidad intrínseca deseada (por lo tanto, MW).

El procedimiento consta de dos o tres etapas:

- inactivación (esta etapa está presente solo para la producción de HA a partir del caldo de fermentación de *Bacillus* y *Streptococcus*);
- extracción,
- purificación.

Inactivación: esta etapa se refiere a la producción de HA a partir de *Streptococcus* (y también de *Bacillus*) que se fermenta en fermentadores específicos que contienen medios de cultivo adecuados en las condiciones conocidas por los expertos en la técnica. Este procedimiento es seguido por la fase de inactivación de las bacterias mediante la acidificación del caldo de cultivo, preferentemente con HCl, para disminuir el pH a un valor entre 4 y 5, a este valor, de hecho, el *Streptococcus* cesa completamente su actividad metabólica.

Esto es seguido por el tratamiento térmico del caldo inactivo mediante calentamiento (descrito a continuación) para la producción de un HA que tiene una viscosidad alta o media o con una viscosidad baja. Este tratamiento no se efectúa en el caso de la producción de HA que tiene una viscosidad muy alta. Como se indicó anteriormente, de hecho, los intervalos de MW específicos corresponden a intervalos de viscosidad específicos y de esta manera el Solicitante ha desarrollado un procedimiento que permite la producción de las fracciones deseadas con absoluta precisión, como se demuestra a continuación.

La biomasa se elimina filtrando el caldo inactivado en almohadillas de Celite (tierra de diatomeas, nombre químico: dióxido de sílice), con una posible filtración posterior adicional a través de un filtro con un grado de filtración igual a 0,5 µm (son preferidos los filtros de propileno); el caldo se neutraliza preferentemente con soda (NaOH) a un pH de 6,5-7,5.

Extracción: esta fase es común tanto para la producción de HA a partir de *Streptococcus* y *Bacillus* como para la HA obtenida a partir de crestas de gallo; en el último caso, el procedimiento de acuerdo con la invención parte del homogenado obtenido de las crestas según lo descrito en el documento de patente EP 0138572. Más específicamente, el homogenado se somete a tratamiento térmico mediante calentamiento (descrito a continuación) para la producción de un HA que tiene alta, media o baja viscosidad. Este tratamiento térmico se efectúa simultáneamente con la digestión enzimática (a la que se somete dicho homogenado, definido en lo sucesivo como homogenado enzimático digerido) con la enzima papaína preparada en un tampón fosfato, como es conocido por las personas expertas en el campo. El ácido hialurónico no purificado presente en el filtrado neutralizado o presente en la mezcla de digestión enzimática sometida a tratamiento térmico (en lo sucesivo definido como medio que contiene HA no purificado), es complejoado posteriormente con CPC (Cloruro de Cetil Piridinio, se forma la sal de CPC-HA) después de una adición adicional de Celite bajo agitación. El complejo se deja sedimentar para separar el sólido de la fase líquida que se elimina. El HA presente en la fase sólida se

solubiliza luego bajo agitación, con una solución salina de NaCl y el producto obtenido (sal de sodio de HA soluble en este medio), se somete a filtraciones/purificaciones adicionales mediante paños de filtración para separar el Celite residual y, por medio de filtros con un grado de filtración igual a 3 µm (siendo preferidos los filtros de polipropileno), recoger el filtrado. Este procedimiento particular se define como "extracción" de la sal de sodio de HA aún no purificada, y puede realizarse de 1 a 4 veces. Después de recoger y unir los productos filtrados, el producto así "extraído" es tratado con resinas particulares del tipo aromático adecuadas para absorber moléculas de gran tamaño gracias al radio de poro que varía de 200 a 300 Angstrom, contribuyen decisivamente a reducir la impureza total de HA derivado del sistema de origen del cual se purificó el polisacárido y también de las sustancias utilizadas en el procedimiento anterior. La resina que consiste en matrices de poliestireno reticulado se usa preferentemente, la resina DIAION HP20 (o HP20L) (MITSUBISHI CHEMICAL) ha demostrado ser particularmente eficiente. Dicho tratamiento consiste en dejar la resina y el extracto bajo agitación durante un período de tiempo. Luego, el producto obtenido se filtra por medio de filtros/telas preferentemente hechas de polipropileno (para separar las resinas de la sal de sodio de HA), posiblemente también en filtros de grado de filtración de 3 µm.

Purificación: esta etapa final puede estar precedida posiblemente por la precipitación en etanol de la sal de sodio de HA obtenida en la fase de extracción (esta etapa puede introducirse para purificar aún más el polisacárido, especialmente cuando se trata de crestas de gallo). La eliminación del solvente anterior es seguida por la redisolución del precipitado en agua, luego se procede con las siguientes etapas de "purificación": adición de NaOH en agua para la eliminación total de las toxinas residuales, neutralización, preferentemente con HCl (a 37 °C). % en peso), hasta un pH que varía entre 8 y 9 (el término "neutralización" simplemente se usa en esta fase para indicar la intención del Solicitante de disminuir el pH a valores más cercanos a la neutralidad), filtración preferentemente por medio de filtros que tienen un grado de filtración de 3 µm, precipitación y al menos un lavado con etanol, lavado final en un solvente orgánico, preferentemente acetona. La sal de sodio de HA así producida y purificada se seca como se es conocido por las personas expertas en el campo.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere al procedimiento de preparación y purificación de la sal de sodio de HA esquematizada a continuación en sus fases:

A. Inactivación (para la purificación de un HA producido a partir de la fermentación de *Streptococcus* y *Bacillus*):

- A1. acidificación del caldo de fermentación a un pH de 4-5; usándose preferentemente HCl 1N;
- A2. tratamiento térmico del caldo, bajo agitación (este tratamiento no se efectúa si se produce un HA con una viscosidad muy alta);
- A3. eliminación de la biomasa mediante filtración en almohadillas de Celite (nombre químico: dióxido de sílice; en una cantidad de 20 a 60 g/litro de caldo, preferentemente 30-40 g/litro), posible filtración adicional con filtros que tienen un grado de filtración de 0,5 µm, preferentemente filtros de polipropileno;
- A4. neutralización a pH de 6,5-7,5, preferentemente con NaOH acuoso al 20%.

B. Extracción:

en el caso del homogenado de las crestas, el tratamiento térmico correspondiente se efectúa primero simultáneamente con su digestión enzimática y posterior filtración (para eliminar el residuo biológico no digerido), seguido de las siguientes fases comunes:

- B1 adición de Celite (en una cantidad de 20 a 60 g/litro de caldo/litro de digestión enzimática, es decir, por litro de medio que contiene HA no purificado) y formación de complejos con Cloruro de Cetil Piridinio (CPC) (4-20g/litro/litro de digestión enzimática, preferentemente 5-15 g/litro), bajo agitación, durante al menos 30 minutos y posterior sedimentación durante al menos 30 minutos;
- B2. eliminación de la fase líquida;
- B3. solubilización del HA presente en la fase sólida en NaCl (usándose preferentemente una solución acuosa 0,3 M) bajo agitación durante un período de 4 a 24 horas, filtración por medio de paños filtrantes para separar el Celite residual y los filtros con un grado de filtración de 3 µm (siendo preferidos los filtros de polipropileno) y la recolección del primer extracto como sal de sodio de HA; este procedimiento debe repetirse de 1 a 4 veces;
- B4. Unir los extractos;
- B5. Adición de los extractos unidos de una resina del tipo aromático (en una cantidad de 10 a 60 g/litro de extracto) con un radio de poro de 200-300 Angstrom, se prefiere la resina compuesta de matrices de poliestireno reticulado, la resina DIAION HP20 (o HP20L) es aún más preferida, este tratamiento se realiza bajo agitación durante al menos 8 horas;
- B6. al menos una filtración por medio de paños filtrantes (preferentemente hechas de polipropileno) para separar las resinas de la sal de sodio de HA, y posiblemente al menos una filtración con filtros de grado de filtración de 3 µm (para esta filtración, siendo preferidos los filtros de polipropileno).

C. Purificación:

en el caso de la sal de sodio de HA obtenida de las crestas de gallo, esta etapa posiblemente puede estar precedida por la precipitación en etanol de la sal de sodio de HA obtenida en la etapa anterior, con la eliminación del solvente anterior y la re-solubilización del precipitado en agua purificada (Ph. Eur. 8.0, 01/2009:0008) para restaurar el volumen inicial y, posteriormente, continuar con las siguientes fases de purificación, independientemente de la fuente seleccionada:

- C1. adición de NaOH (usándose preferentemente una solución 0,2-0,4 M) en agua, bajo agitación;
- C2. neutralización a un pH que varía de 8 a 9, preferentemente con HCl (al 37%);
- C3. filtración, es preferente un filtro con un grado de filtración de 3 µm (siendo preferidos los filtros de polipropileno);
- C4. precipitación y al menos un lavado de la sal de sodio de la sal de sodio de HA procedente de la etapa C3 con etanol, lavado final en un solvente orgánico, preferentemente acetona;
- C5. secado de la sal de sodio de HA tal como es conocido por las personas expertas en el campo, preferentemente de 25 a 40 °C durante no menos de 15 horas, al vacío.

Determinación del MW promedio en peso de la sal de sodio de HA

El objeto del tratamiento térmico de la presente invención permite la producción de la sal de sodio de HA con una viscosidad intrínseca (IV) que cae dentro de intervalos específicos (IV medida de acuerdo con el procedimiento descrito en Ph. Eur. 5.0. 01/2005; Ph. Eur. 1472), que se describe a continuación:

Tratamiento térmico de HA a partir del caldo de fermentación de *Streptococcus* o *Bacillus*:

- 60 ± 5 °C durante 5-40 minutos: esto permite la producción de un HA con una viscosidad alta, por lo tanto, una sal de sodio de HA que tiene una IV final dentro del intervalo de **17-24** dl/g; el tratamiento térmico anterior se lleva a cabo preferentemente a 65 °C durante 5-30 minutos;
 - 70 ± 5 °C durante 5-40 minutos: esto permite la producción de un HA con una viscosidad media, por lo tanto, una sal de sodio de HA que tiene una IV final dentro del intervalo de **10-15** dl/g; el tratamiento térmico anterior se lleva a cabo preferentemente a 70 °C durante 5-30 minutos;
 - 90 ± 5 °C durante 150-300 minutos: esto permite la producción de un HA con viscosidad baja, por lo tanto, una sal de sodio de HA que tiene una IV final dentro del intervalo de **3-6** dl/g;
- Si no se efectúa el tratamiento térmico, la IV final de la sal de sodio de HA, purificada según el objeto de la invención, es igual o superior a **29** dl/g, por lo tanto, el producto purificado es una sal de sodio de HA que tiene una viscosidad muy alta.

Tratamiento térmico de HA de crestas de gallo:

- 50-60 °C durante 26-30 horas: esto permite la producción de un HA con una viscosidad alta, por lo tanto, una sal de sodio de HA que tiene una IV final dentro del intervalo de **17-24** dl/g; el tratamiento térmico anterior se lleva a cabo preferentemente a 55 °C durante 28 horas;
- 60-65 °C durante 28-30 horas: esto permite la producción de un HA con una viscosidad media, por lo tanto, una sal de sodio de HA que tiene una IV final dentro del intervalo de **10-15** dl/g; el tratamiento térmico anterior se lleva a cabo preferentemente a 60 °C durante 30 horas;
- 65-70 °C durante 46-50 horas: esto permite la producción de un HA con una viscosidad baja, por lo tanto, una sal de sodio de HA que tiene una IV final dentro del intervalo de **3-6** dl/g; el tratamiento térmico anterior se lleva a cabo preferentemente a 65 °C durante 48 horas.

Al final del tratamiento, una persona experta en el campo puede recolectar una muestra y verificar la viscosidad obtenida, en base al resultado alcanzado, puede repetir la operación o modificar el tiempo y/o la temperatura del tratamiento (aún dentro del intervalo descrito) para alcanzar la viscosidad deseada: los tiempos y temperaturas de tratamiento para alcanzar los intervalos de IV descritos anteriormente dependen, de hecho, de la concentración y MW del HA presente en el caldo/digestión inicial.

La ecuación de Mark-Houwink (Terbojevich M. et al, *Carbohydrate Research*, 1986, 149, 363-377; Terbojevich M. et al, *Carbohydrate Research*, 1986, 157, 269-272) se utiliza para especificar los MW promedio correspondientes, la ecuación relaciona la VI con el MW. Por consiguiente, los intervalos de viscosidad corresponden a intervalos específicos de MW:

- 29 dl/g corresponde a aproximadamente **1885** kDa
- 17-24 dl/g corresponde a un intervalo de aproximadamente **920 a 1450** kDa
- 10-15 dl/g corresponde a un intervalo de aproximadamente **450 a 780** kDa
- 3-6 dl/g corresponde a un intervalo de aproximadamente **90 a 231** kDa.

Con la siguiente experimentación, el Solicitante ha demostrado la eficacia del procedimiento objeto de la

invención, en términos de pureza de la sal de sodio de HA obtenida.

Purificación de la sal de sodio de HA producida por *Streptococcus*

Al final del procedimiento de fermentación de *Streptococcus equi* 68222 mutante H-1, fermentado como en el Ejemplo 3 del documento de patente EP 0716688, se recogen aproximadamente 5 litros de caldo y se contaminan con *E. coli* ATCC 8739 en una cantidad de 10^9 células bacterianas por ml de caldo. Este caldo se deja en un recipiente abierto (para favorecer una mayor contaminación por bacterias o por levaduras/hongos cuyas esporas pueden estar presentes en el aire) durante un tiempo no inferior a 16 horas, a temperatura ambiente. Luego se divide en dos muestras: 2,5 litros (muestra A) se someten al procedimiento de purificación completo objeto de la invención, mientras que los 2-5 litros restantes (muestra B) se someten a precipitación simple, como se describe a continuación. Una muestra de caldo se somete a **control microbiológico** mediante análisis cualitativos y cuantitativos (mediante el *Sistema API* efectuado de acuerdo con Ph. Eur. 5.0; 2.6.12) de la carga microbiana y/o micótica presente. Los resultados se indican en la Tabla A.

Muestra A: el caldo se somete a inactivación por acidificación a pH de 4,3 con HCl 1N y tratamiento térmico a 65 °C durante 10 minutos, bajo agitación. La biomasa se elimina por filtración en Celite (40 g/l) y se neutraliza a pH de 6,5 con NaOH acuoso al 20%. Esto es seguido por la fase de extracción con la adición de Celite (20 g/l de caldo) y la formación de complejos con CPC (10 g/l de caldo) bajo agitación durante 30 minutos con sedimentación posterior durante 1 hora; la fase líquida entonces se elimina por sifón y el HA presente en la fase sólida se solubiliza en NaCl acuoso 0,3 M, aún bajo agitación durante un período de 20 horas; este procedimiento continúa con la filtración en un paño filtrante y también con filtros con un grado de filtración de 3 µm y la recolección del primer extracto; este procedimiento se repite 2 veces y los dos extractos se unen. Esto es seguido por la adición de una resina del tipo aromático, DIAION HP20 (40 g/l, este tratamiento se efectúa, bajo agitación, durante 8 horas) y filtración para separar las resinas del HA utilizando paños filtrantes de polipropileno. La purificación se lleva a cabo añadiendo NaOH 0,4 M en agua (bajo agitación) y luego se neutraliza a pH 8,5 con HCl (37%) y se filtra con filtros en polipropileno con un grado de filtración de 3 µm. La sal de sodio de HA se precipita con etanol al 100%, se lava con etanol al 80% y el lavado final se realiza en acetona. El secado final de la sal de sodio de HA obtenida y purificada se efectúa a 25 °C durante 20 horas al vacío.

Muestra B: esta muestra fue sometida a inactivación por acidificación a pH de 4,3 con HCl 1N y tratamiento térmico a 65 °C durante 10 minutos con agitación, exactamente como en la Muestra A. La biomasa se eliminó del caldo por filtración en Celite, el filtrado fue sometido luego a precipitación con etanol con secado, a 25 °C, del precipitado con HA (no purificado), durante 20 horas al vacío.

El HA purificado no debe ser pirogénico, es decir, no debe haber elementos que puedan causar un aumento de la temperatura corporal después de su administración. La prueba para evaluar la no-pirogénesis puede llevarse a cabo de varias maneras: la *Prueba LAL* (para la determinación específica in vitro de la endotoxina LPS derivada de gramnegativos, requerida por Ph. Eur. 5.0 en la monografía relativa al *Hialuronato de Sodio*), la *Prueba de Pirógenos* (análisis no discriminatorio *in vitro* sobre la naturaleza del agente de pirógenos) y *Endosafe®-IPT* (prueba *in vitro* no requerida por la Farmacopea).

Prueba LAL: la base de la prueba LAL es la capacidad de los amebocitos extraídos de la sangre de *Limulus polyphemus* para gelificarse en presencia de endotoxinas bacterianas de gramnegativos, responsables principalmente del efecto pirógeno. Esta prueba se lleva a cabo de acuerdo con Ph. Eur. 5.0, 2.6.14.

Prueba de Pirógenos: esta prueba representa el procedimiento de análisis más utilizado para determinar la presencia de sustancias pirógenas, contempla el uso de conejos en los que se inyecta una pequeña dosis del producto en la vena del oído externo, la temperatura de referencia se toma tres horas después de la inyección. El aumento de la temperatura es un signo de pirogenicidad del producto. Esta prueba se lleva a cabo de acuerdo con Ph. Eur. 5.0, 2.6.8.

Endosafe® - IPT (Charles River Laboratories, Inc.): prueba capaz de detectar la presencia de pirógenos de cualquier tipo, ya que pueden estimular la producción de citoquinas IL-1β que es altamente proinflamatoria. Esta prueba permite la identificación de pirógenos tanto de naturaleza endotóxica (LPS) como no endotóxica (LTA y/o proteínas y/o derivados de pirógenos, por ejemplo, de virus o levaduras/mohos): consta de dos etapas, en la primera etapa, la muestra se incuba con sangre humana (si está presente, los pirógenos estimulan la producción de IL-1β por los monocitos de la sangre), la segunda etapa consiste en la detección de la presencia de IL-1β producida por una prueba ELISA de lectura específica a 450 nm (Schindler S. et al, ALTEX, 2009, 26, 265-277).

Para las muestras A y B, el análisis de los pirógenos se realizó mediante la Prueba de pirógenos y Endosafe®-IPT, ya que la Prueba LAL no es capaz de evaluar la posible presencia de agentes pirógenos distintos de la endotoxina LPS, mientras que los otros dos procedimientos revelan pirógenos de cualquier naturaleza, incluso con diferentes sensibilidades. La prueba IPT, de hecho, permite identificar residuos bacterianos provenientes tanto de grampositivos como de gramnegativos, y supera la Prueba de Pirógenos en lo que respecta a la

sensibilidad. Además, el IPT es más específico que la prueba en conejos, ya que evalúa la toxicidad de los contaminantes en el tejido humano (Hartung T. et al, ATLA, 2001, 29, 99-123). Para ambas muestras, el contenido de proteína total determinado a partir de Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472, también fue evaluado. Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla B.

Resultados

Tabla A: en esta tabla, se puede observar la presencia de una importante carga bacteriana y también micótica en términos de organismos no patógenos y organismos patógenos como *B. Cereus*, *Coli* y *Candida*.

Carga microbiana	<i>Bacillus Cereus</i>	$4,6 \times 10^7/\text{ml}$
	<i>Streptococcus</i>	$2,2 \times 10^7/\text{ml}$
	<i>E. Coli</i>	$9,8 \times 10^6/\text{ml}$
	Carga Total	$7,8 \times 10^7/\text{ml}$
Carga micótica	Moho	$9,4 \times 10^7/\text{ml}$
	Levadura (<i>Candida Lusitaniae</i>)	$2,5 \times 10^7/\text{ml}$
	Carga Total	$1,2 \times 10^8/\text{ml}$

Por lo tanto, la tabla muestra cómo el caldo inicial contaminado específicamente contenía elementos de pirógenos de ambos grampositivos y gramnegativos, además de varios tipos de pirógenos, como los derivados de *Candida*.

Tabla B

NR: no detectable (inferior a 0,05 EEU/mg)			
	Prueba de Pirogenos	IPT	Contenido de proteínas
Muestra A	0,9 °C	N,R,	0,04%
Muestra B	4,1 °C	>5 EU/mg	10%

Estos datos muestran que el nuevo procedimiento de purificación es capaz de purificar HA a partir de varios tipos de agentes de pirógenos:

Se puede notar a partir de la Tabla B que la prueba **IPT** de la muestra B muestra un valor muy alto de toxinas de pirógenos, la monografía de HA Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472, de hecho, permite, para administraciones inyectables de HA, un límite máximo de endotoxinas inferior a 0,05 UI/mg (es decir, 0,05 EU/mg). En la muestra B, por lo tanto, hay una concentración de pirógenos al menos 100 veces mayor que este límite. En los tres conejos tratados para la **Prueba de Pirógenos**, esta concentración provoca un aumento general de la temperatura de 4,1 °C. De conformidad con la Ph. Eur. 5.0, 2.6.8, el producto satisface la *Prueba de Pirógenos*, si la suma de los tres aumentos de temperatura no excede el valor de 1,15°, por lo tanto, la muestra B resultó ser fuertemente pirógena, lo que confirma los datos de la prueba **IPT**. Finalmente, esta muestra tiene un porcentaje de **proteína** total muy alto derivado de los medios utilizados para la fermentación de *Streptococcus*, y de la misma bacteria no completamente eliminada: monografía de HA Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472 límites, por administraciones parenterales, las proteínas totales a un valor máximo que no excede el 0,1%, por lo tanto, también en este caso, la muestra B tiene un valor de proteína aproximadamente 100 veces mayor que el valor límite.

La Muestra A, purificada de acuerdo con el objeto de la invención, satisface todos los requisitos para la administración inyectable de la sal de sodio de HA: pirógenos *in vivo* con un aumento de temperatura inferior a 1,15 °C, toxinas *in vitro* inferiores a 0,05 EU/mg, y contenido general de proteínas inferior al 0,1% (Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472).

Este resultado demuestra la eficacia del procedimiento objeto de la invención, ya que asegura la purificación total de la sal de sodio de HA incluso de una muestra particularmente contaminada, tanto de endotoxinas como de varios tipos de pirógenos, garantizando la seguridad del producto que, de esta manera, cumple todos los requisitos también en términos de purezas más limitantes, como se demuestra a continuación.

Ejemplo 1: Preparación y purificación de la sal de sodio de HA de *Streptococcus* con IV dentro del intervalo de 10-15 dl/g

Al final del procedimiento de fermentación de *Streptococcus equi* (68222 mutante H-1) fermentado según el Ejemplo 3 de EP0716688), se inactivan 5 litros de caldo por acidificación a pH de 4,5 con HCl 1N. Esto es

seguido por el tratamiento térmico del caldo con un aumento de temperatura a 70 °C durante 20 minutos bajo agitación. Luego se filtra el caldo y se vierte en un filtro Buchner en el que se prepararon 200 g de Celite sobre un paño filtrante. Al final de la filtración, el producto se neutraliza con NaOH acuoso al 20% y el pH se fija en 7,0. Se agregan 100 g de tierra de diatomeas y posteriormente CPC en una cantidad igual a 11 g/l de caldo, bajo agitación, durante 30 minutos, al caldo filtrado. Toda la mezcla se deja reposar durante 40 minutos para permitir la sedimentación del complejo CPC-HA recién formado. La fase líquida se elimina por sifón. El HA presente en la fase sólida se solubiliza por medio de una solución de NaCl acuoso 0,3 M, bajo agitación durante 10 horas. La sal de sodio de HA finalmente se filtra a través de un paño de filtración y cartuchos de filtración que tienen un grado de filtración de 3 µm (Pall). Se añaden 200 g de resinas Diaion HP20 al extracto que se deja bajo agitación durante 10 horas. Toda la mezcla se filtra sobre un paño de propileno y luego, en secuencia, a través de filtros (Pall) con un grado de filtración de 3 µm. Se agrega NaOH acuoso a la solución de extractos, que se neutraliza con HCl (al 37%), llevando el pH a un valor de 8,5. Los extractos se filtran luego a través de un filtro con un grado de filtración de 3 µm. La solución de sal de sodio de HA se precipita con etanol y se mantiene bajo agitación durante 30 minutos. El producto se deja reposar durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina por sifón. El producto se lava con etanol (bajo agitación durante 10 minutos), y el sobrenadante se elimina por sifón (como alternativa, en el caso de cantidades de caldo superiores a 5 litros, el producto sólido se recupera por filtración en un paño filtrante). El último lavado con acetona se lleva a cabo y el sólido se recupera por filtración en un paño filtrante. El producto obtenido se coloca en bandejas de acero inoxidable adecuadas y se seca durante 22 horas a una temperatura de 25 °C al vacío.

Análisis del producto obtenido (de acuerdo con Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472):

IV: 14,5 dl/g (MW promedio en peso: 748.000 Daltons)

Proteínas: 0,02%

Endotoxinas bacterianas (prueba LAL): 0,012 EU/mg

Rendimiento: para la determinación del rendimiento total del procedimiento objeto de la invención, se determina la concentración de HA en carbazol (Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472) presente en el caldo al final de la fermentación, y está relacionado con la concentración final de HA obtenida al final del procedimiento de purificación (es decir, la relación se calcula entre la cantidad en gramos de producto final frente a los litros de caldo al final de la fermentación (luego sometida a purificación), se calcula una simple proporción posteriormente para obtener el valor de rendimiento expresado como porcentaje de HA purificado frente al HA inicial a purificar).

En este caso, se determinaron 3,3 g/litro de HA en el caldo al final de la fermentación, y 3,0 g/l de HA como producto purificado. Por lo tanto, el rendimiento final fue superior al 90%.

Ejemplo 2: Preparación y purificación de la sal de sodio de HA a partir de crestas de gallo con IV dentro del intervalo de 10-15 dl/g

Se mezclan 250 g de polvo seco preparado a partir de crestas de gallo como se describe en el Ejemplo 1 de EP0138572, con 0,29 g de papaína en 10 litros de tampón dibásico de fosfato de sodio/dihidrato de fosfato de sodio/EDTA (pH 6,5), bajo agitación durante 10 minutos. Esta mezcla se somete a tratamiento térmico aumentando su temperatura a 60 °C durante 30 horas. El homogenado resultante se filtra y se descarga en un Buchner en el que se han preparado 200 g de Celite en un paño filtrante de polipropileno. Se agregan 200 g de Celite al producto filtrado con agitación y luego se agregan 2 litros de solución acuosa de CPC (a 29 g/l) a dicho producto filtrado, dejando bajo agitación durante 30 minutos. Luego, la mezcla se deja reposar durante 40 minutos para permitir la sedimentación del complejo CPC-HA recién formado y la fase líquida se elimina por sifón. El HA presente en la fase sólida se solubiliza con una solución de 4 litros de NaCl acuoso 0,3 M, bajo agitación durante 10 horas. Por último, la sal de sodio de HA se filtra a través de un paño de filtración y cartuchos de filtración que tienen un grado de filtración de 3 µm (Pall). En este punto, se añaden 200 g de resinas Diaion HP20L al extracto y la mezcla se deja bajo agitación durante 10 horas. Luego se filtra toda la mezcla sobre paño de polipropileno y posteriormente, en secuencia, a través de filtros de grado de filtración de 3 µm (Pall). La sal de sodio de HA se precipita con 1,8 volúmenes de etanol, bajo agitación durante 30 minutos; el producto se deja sedimentar y el sobrenadante se elimina por sifón. El producto sedimentado se vuelve a solubilizar con 5 litros de agua purificada, bajo agitación.

Se agrega NaOH acuoso 0,2 M a la solución obtenida, que se neutraliza con HCl (37%), llevando el pH a 8,2. La filtración continúa usando filtros de grado de filtración de 3 µm. La sal de sodio de HA obtenida se precipita con etanol bajo agitación durante 30 minutos, el producto se deja reposar durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina por sifón. El producto se lava con etanol, se deja reposar durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina por sifón (como alternativa, en el caso de cantidades de caldo superiores a 5 litros, el producto sólido se recupera por filtración en un paño filtrante). El último lavado con acetona se lleva a cabo y el sólido se recupera por filtración en un paño filtrante. El producto obtenido se coloca en bandejas de acero inoxidable adecuadas y se seca durante 22 horas a una temperatura de 40 °C al vacío.

Análisis del producto obtenido (de acuerdo con Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472):

IV: 14 dl/g (MW promedio en peso: 714.000 Daltons)

Proteínas: 0,04%

Endotoxinas bacterianas (prueba LAL): 0,012 EU/mg

Rendimiento: en este caso, para la determinación del rendimiento total del procedimiento, la concentración de HA en carbazol se determina por litro de digestión enzimática, y está relacionada con la concentración final de HA obtenida al final del procedimiento de purificación (es decir, la relación se calcula entre la cantidad en gramos del producto final frente a los litros de digestión enzimática (luego sometida a purificación), luego se calcula una proporción simple para obtener el valor de rendimiento expresado como porcentaje de HA purificado frente al HA inicial a purificar).

En este caso, el rendimiento final de HA fue superior al 85%.

Ejemplo 3: Preparación y purificación de la sal de sodio de HA de *Streptococcus* con IV dentro del intervalo de 3-6 dl/g

El procedimiento es el mismo que el descrito en el Ejemplo 1, pero el tratamiento térmico realizado es a 90 °C durante 250 minutos. El producto final se seca durante 25 horas a 40 °C, al vacío. Análisis del producto obtenido (de acuerdo con Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472):

IV: 5 dl/g (MW promedio en peso: 181.000 Daltons)

Proteínas: 0,015%

Endotoxinas bacterianas (prueba LAL): 0,0075 EU/mg

Rendimiento: en este caso, se determinaron 3,3 g/litro de HA en el caldo al final de la fermentación, y 2,5 g/litro como producto purificado. Por lo tanto, el rendimiento final fue superior al 75%.

Por esta razón, un objeto adicional de la presente invención se refiere al procedimiento de purificación de HA en el que los valores máximos de proteínas y toxinas totales reivindicadas para la sal de sodio de HA, además del rendimiento total al final del procedimiento son:

- 0,05% de proteínas vs. 0,1% establecido en Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472;

- 002 UI/mg de endotoxinas vs. el límite máximo de 0,05 UI/mg permitido en Ph. Eur. 5.0, 01/2005: 1472;

Rendimiento: del **75 al 90%**.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de ácido hialurónico (HA) a partir del caldo de fermentación de *Streptococcus* o *Bacillus* o a partir de crestas de gallo que comprende las siguientes etapas:

B. extracción, que comprende las siguientes etapas:

- B1. adición de Celite a un medio que contiene HA no purificado y formación de complejos de HA con Cloruro de Cetil Piridinio (CPC), bajo agitación durante al menos 30 minutos y seguida de sedimentación durante al menos 30 minutos adicionales;
 B2. eliminación de la fase líquida formada en la etapa B1;
 B3. solubilización del HA presente en la fase sólida en una solución acuosa de NaCl y recolección de un primer extracto como sal de sodio de HA; este procedimiento B3 se efectúa de 1 a 4 veces;
 B4. unión de los extractos procedentes de la(s) etapa(s) B3;
 B5. adición de una resina aromática que tiene un radio de poro que varía de 200 a 300 Angstrom a los extractos unidos de B4, siendo preferida la resina compuesta por matrices de poliestireno reticulado, dejando bajo agitación durante al menos 8 horas;
 B6. filtración de la mezcla procedente de la etapa B5;

C. purificación, que comprende las siguientes etapas:

- C1. adición de una solución acuosa de NaOH al filtrado obtenido de la etapa B6;
 C2. neutralización a un pH que varía de 8 a 9, preferentemente con HCl;
 C3. al menos una filtración;
 C4. precipitación y al menos un lavado de la sal de sodio de HA obtenida en la etapa C3 con etanol, lavado final en un solvente orgánico, preferentemente acetona;
 C5. secado de la sal de sodio de HA, preferentemente entre 25 y 40 °C durante no menos de 15 horas, al vacío.

2. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el caldo de fermentación de *Streptococcus* es un caldo de fermentación de *Streptococcus equi* subespecie *equi* 68222, mutante H-1.

3. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA a partir del caldo de fermentación de *Streptococcus* o *Bacillus* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el procedimiento comprende una etapa inicial previa de inactivación A. del caldo de fermentación, que comprende las siguientes etapas:

- A1. acidificación del caldo de fermentación a pH de 4-5, preferentemente con HCl;
 A2. eliminación de la biomasa de *Streptococcus* o *Bacillus* por al menos una filtración;
 A3. neutralización a pH de 6,5-7,5, preferentemente por medio de NaOH.

4. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la fase de desactivación comprende un tratamiento térmico del caldo de fermentación mediante calentamiento para la producción de un HA de alta, media o baja viscosidad.

5. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo aumentando la temperatura del caldo a 60 ± 5 °C durante 5-40 minutos para la producción de una sal de sodio de HA que tiene una viscosidad intrínseca final (IV) dentro del intervalo de 17-24 dl/g, el tratamiento térmico se lleva a cabo preferentemente a 65 °C durante 5-30 minutos.

6. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo aumentando la temperatura del caldo a 70 ± 5 °C durante 5-40 minutos para la producción de una sal de sodio de HA que tiene una viscosidad intrínseca final (IV) dentro del intervalo de 10-15 dl/g, el tratamiento térmico se lleva a cabo preferentemente a 70 °C durante 5-30 minutos.

7. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el tratamiento térmico se lleva a cabo aumentando la temperatura del caldo a 90 ± 5 °C durante 150-300 minutos para la producción de una sal de sodio de HA que tiene una viscosidad intrínseca final (IV) dentro del intervalo de 3-6 dl/g.

8. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA a partir de crestas de gallo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de extracción está precedida por un tratamiento térmico de un homogenado de crestas de gallo por calentamiento y digestión enzimática contemporánea, para la producción de un HA de alta, media o baja viscosidad.
9. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el tratamiento térmico se efectúa aumentando la temperatura a 50-60 °C durante 26-30 horas para preparar una sal de sodio de HA que tiene una viscosidad intrínseca final (IV) dentro del intervalo de 17-24 dl/g, el tratamiento térmico se lleva a cabo preferentemente a 55 °C durante 28 horas.
10. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el tratamiento térmico se efectúa aumentando la temperatura a 60-65 °C durante 28-30 horas para preparar una sal de sodio de HA que tiene una viscosidad intrínseca final (IV) dentro del intervalo de 10-15 dl/g, el tratamiento térmico se lleva a cabo preferentemente a 60 °C durante 30 horas.
11. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el tratamiento térmico se efectúa aumentando la temperatura a 65-70 °C durante 46-50 horas, para la producción de una sal de sodio de HA que tiene una viscosidad intrínseca final (IV) dentro del intervalo de 3-6 dl/g, el tratamiento térmico se lleva a cabo preferentemente a 65 °C durante 48 horas.
12. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA a partir de crestas de gallo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 8-11, en el que la etapa de purificación C. está precedida por una precipitación en etanol de la sal de sodio de HA obtenida en la etapa de extracción B., eliminación del solvente y solubilización del precipitado en agua purificada.
13. Un procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA del caldo de fermentación de *Streptococcus* o *Bacillus* de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1-3, que comprende las siguientes etapas:
 - A. inactivación del caldo de fermentación, que comprende las siguientes etapas:
 - A1. acidificación del caldo a pH de 4-5, usándose preferentemente HCl 1N;
 - A2. posible tratamiento térmico del caldo, bajo agitación;
 - A3. eliminación de la biomasa de *Streptococcus* o *Bacillus* por filtración en almohadillas de Celite en una cantidad de 20 a 60 g/litro de caldo, preferentemente 30-40 g/l, posible filtración con filtros que tienen un grado de filtración de 0,5 µm, siendo preferidos los filtros de polipropileno;
 - A4. neutralización a pH de 6,5-7,5, preferentemente con NaOH acuoso al 20%;
 - B. extracción, que comprende las siguientes etapas:
 - B1. adición al filtrado A3 de Celite en una cantidad de 20 a 60 g/litro de caldo y formación de complejos con CPC 4-20 g/litro, preferentemente 5-15 g/litro, bajo agitación durante al menos 30 minutos y posterior sedimentación durante al menos 30 minutos adicionales;
 - B2. eliminación de la fase líquida;
 - B3. solubilización del HA presente en la fase sólida en NaCl acuoso 0,3 M bajo agitación durante un período que varía de 4 a 24 horas, filtración por medio de filtros que tienen un grado de filtración de 3 µm y recolección del primer extracto como sal de sodio de HA; este procedimiento B3 se efectúa de 1 a 4 veces;
 - B4. unión de los extractos;
 - B5. adición de una resina aromática en una cantidad de 10 a 60 g/litro de extracto, que tiene un radio de poro que varía de 200 a 300 Angstrom, a los extractos unidos de B4, siendo preferida la resina compuesta por matrices de poliestireno reticulado, dejando bajo agitación durante al menos 8h;
 - B6. filtraciones que comprenden paños de filtración, posiblemente también filtros con un grado de filtración de 3 µm, siendo preferidos los filtros de polipropileno;
 - C. purificación, que comprende las siguientes etapas:
 - C1. adición de NaOH 0,2-0,4 M en agua, bajo agitación, al producto filtrado B6;
 - C2. neutralización a un pH que varía de 8 a 9, preferentemente con HCl;
 - C3. filtración, siendo preferido un grado de filtración igual a 3 µm, siendo más preferidos los filtros de polipropileno;
 - C4. precipitación y al menos un lavado de sal de sodio de HA obtenida de la etapa C3, con etanol, lavado final en un solvente orgánico, preferentemente acetona;

C5. secado de la sal de sodio de HA tal como se conoce por los expertos en el campo, preferentemente entre 25 y 40 °C durante no menos de 15 horas, al vacío.

14. El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA a partir de crestas de gallo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de extracción B. está precedida por el tratamiento térmico de un homogenado de crestas por calentamiento y digestión enzimática contemporánea, para la producción de HA de alta, media o baja viscosidad, que comprende las siguientes etapas:

B. extracción, que comprende las siguientes etapas:

- B1. Adición a la enzima digerida de Celite en una cantidad de 20 a 60 g/litro de homogenado enzimático y formación de complejos con CPC en una cantidad de 4 a 20 g/litro, preferentemente 5-15 g/litro, bajo agitación durante al menos 30 minutos y posterior sedimentación durante al menos 30 minutos adicionales;
 B2 eliminación de la fase líquida;
 B3. solubilización del HA presente en la fase sólida en NaCl acuoso 0,3 M bajo agitación durante un período de 4 a 24 horas, filtración por medio de filtros que tienen un grado de filtración de 3 µm y recolección de un primer extracto como sal de sodio de HA; este procedimiento B3 se efectúa de 1 a 4 veces;
 B4. unión de los extractos procedentes de la(s) etapa(s) B3;
 B5. adición de una resina aromática en una cantidad de 10 a 60 g/litro de extracto, que tiene un radio de poro que varía de 200 a 300 Angstrom, a los extractos unidos de B4, preferentemente una resina compuesta de matrices de poliestireno reticulado, dejando bajo agitación durante al menos 8 horas;
 B6. filtraciones que comprenden paños de filtración, posiblemente también filtros con un grado de filtración de 3 µm, siendo preferidos los filtros de polipropileno;

C. purificación, que comprende las siguientes etapas:

- C1. adición de NaOH 0,2-0,4 M en agua, bajo agitación, al producto filtrado de B6;
 C2. neutralización a un pH que varía de 8 a 9, preferentemente con HCl;
 C3. filtración, siendo preferido un grado de filtración igual a 3 µm, preferentemente usando filtros de polipropileno;
 C4. precipitación y al menos un lavado de sal de sodio de HA obtenida de la etapa C3, con etanol, lavado final en un solvente orgánico, preferentemente acetona;
 C5. secado de la sal de sodio de HA, preferentemente a una temperatura entre 25 y 40 °C durante no menos de 15 horas, al vacío.

- . El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA a partir de crestas de gallo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la etapa de purificación C. está precedida por una precipitación en etanol de la sal de sodio de HA obtenida en la etapa de extracción B., eliminación del solvente y solubilización del precipitado en agua purificada.

- . El procedimiento para la preparación y purificación de la sal de sodio de HA de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el rendimiento del procedimiento varía de 75 a 90% y los valores máximos de proteínas y toxinas totales de la sal de sodio de HA obtenida son:

- a. 0,05% de proteínas;
 b. 0,02 UI/mg de endotoxinas.

- . Una sal de sodio de HA preparada y purificada de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 7, 11, 12 y 14-16, que tiene una viscosidad intrínseca final (IV) dentro del intervalo de 3-6 dl/g.

- . Una sal de sodio de HA preparada y purificada de acuerdo con la reivindicación 17, para la preparación de derivados de HA, preferentemente sus sales con metales pesados, ésteres, amidas, sulfonatos y productos reticulados entre los que se prefieren los productos reticulados.

- . Una sal de sodio de HA preparada y purificada de acuerdo con las reivindicaciones 17 y 18, para la preparación de biomateriales bidimensionales en forma de almohadillas, telas tejidas y no tejidas, granulados, películas y geles, también en posible asociación con células de diversos orígenes y/o componentes sanguíneos, tales como, por ejemplo, derivados de plaquetas.