



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

249531
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 19/04
//C 12 R 1/465

(22) Přihlášeno 23 11 84

(21) [PV 8998-84]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 25 11 83
(555224) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 17 07 86

(45) Vydáno 15 09 88

(72)
Autor vynálezu BROWN KAREN K., KANSAS CITY, RUIZ LINDA L. CLEM, LENEXA,
VAN DE RIJN IVO, WINSTON-SALEM (Sp. st. a.)

(73)
Majitel patentu MILES LABORATORIES INC., ELKHART, INDIANA (Sp. st. a.)

(54) Způsob přípravy hyaluronové kyseliny

1

2

Způsob přípravy hyaluronové kyseliny vyznačený tím, že se

a) kultivuje organismus produkující kyselinu hyaluronovou vybraný ze skupiny zahrnující hemolytické streptokoky skupiny A a skupiny C, s výhodou Streptococcus equi, ve standardním kapalném médiu pro kultivaci organismů rodu Streptomyces za aerobních podmínek při teplotě od 30 do 40 °C,

b) ze živného média se extrahuje kyselina hyaluronová a

c) filtrací přes filtr, který váže proteiny, se odstraní proteiny.

Hyaluronovou kyselinu lze použít v lékařství, jakožto náhrady synoviálních kapalin v kloubech.

Předložený vynález se týká způsobu přípravy a čištění a použití hyaluronové kyseliny a jejích solí, a zejména způsobu přípravy hyaluronové kyseliny z mikrobiologického zdroje.

Kyselina hyaluronová je v přírodě se vyskytující polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti empirického vzorce $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$, kde $n > 1000$. Obecná struktura kyseliny hyaluronové je popsána v Merck Index, 9. vyd. [3. výtisk, 1978] str. 624. Je dobře známo, že kyselina hyaluronová a její soli, dále uváděná jako HA, se může získat z alespoň tří zdrojů: lidské pupeční šňůry, kohoutích hřebínků a některých bakteriálních kultur, jako jsou hemolytické streptokoky skupiny A a C. Podle našich znalostí se pro obchodně dostupnou HA dosud používaly lidské pupeční šňůry a kohoutí hřebínky. Je to poněkud překvapující, zejména z hlediska obtíží spojených s použitím těchto dvou zdrojů (jako jsou nízké výtěžky, kontaminace chondroitin sulfátem a pracným způsobem přípravy a čištění).

Vzhledem k tomu, že HA se nalézá ve vodných a sklovitých tělních kapalinách a v synoviálních kapalinách savčích kloubů, je značný zájem o získání čisté HA pro použití jako náhrady kapaliny při korekcích patologických stavů v očích a kloubech. Příprava HA z kohoutích hřebínků a lidské pupeční šňůry a její použití při očních a kloubních aplikacích je popsáno v USA patentu 4 141 973 E. A. Balasze. Tento patent také uvádí detailní přehled technické literatury popisující izolaci, charakteristiku a použití HA.

USA patent 4 303 676 také E. A. Balasze popisuje kosmetické přípravky obsahující sodnou sůl kyseliny hyaluronové s různým rozsahem molekulové hmotnosti připravenou z kohoutích hřebínků, USA patent 4 328 803 L. G. Papa nárokuje použití ultračisté soli kyseliny hyaluronové při oční chirurgii. HA produkt použitý pro tento účel byla sodná sůl kyseliny hyaluronové dostupná pod registrovaným obchodním ná-

zvem HYARTIL[®] od Pharmacia, Inc. a připravená z kohoutích hřebínků.

Jediná nalezená literatura, která popisuje extrakci kyseliny hyaluronové z bakterií (viz Kjem a Lebech Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 84, 162 až 164, 1976) používá médium a postup, který je nepřijatelný z několika důvodů. Popisuje médium, které nepodporuje růst převážné části Streptococci. Postup začíná usmrcením streptokoků teplem. Extrakty organismů uvolňují řady vnitřních znečištěnin, které jsou více méně reaktivní a které se obtížně odstraňují z konečného produktu. Proto je pravděpodobné, že získaná HA se nemůže použít pro injekční aplikaci savcům.

Vzhledem k aplikacím HA pro lékařské účely se vyžaduje, aby HA se injekovala

do těla savcům (např. pro náhrady tělních kapalin). Je tedy velmi důležité, aby injikované produkty byly co nejčistší a zabránilo se tak vedlejším reakcím. Důležitost této čistoty je popsána v USA patentu 4 141 973, kde je popsána příprava ultračistého HA produktu z kohoutích hřebínků nebo alternativně v lidských pupečních šňůr. Kromě čistoty je důležité kontrolovat molekulovou hmotnost HA produktu (např. v 4 141 973 patentu se uvádí, že průměrná molekulová hmotnost je alespoň 750 000 a USA patent 4 303 676 zahrnuje přípravu dvou odlišitelných frakcí s kontrolovanou molekulovou hmotností, jednou nízkou a druhou vysokou). I když je popsán přípravek HA o vysoké molekulové hmotnosti (1 200 000) o vysoké čistotě (to je méně než 0,05 % proteinu), Swann, Arch. Ophthal, 88, 544 až 548 (1972), domníváme se, že neexistuje HA produkt s následujícími výhodami:

1. připravitelný z mikrobiálního zdroje při relativně nízkých nákladech ve vysokém výtěžku a s nízkou reaktivitou po injekci,
2. obsahující vhodně vysokou a kontrolovanou molekulovou hmotnost v úzkém rozmezí a
3. prostý proteinových nečistot typu nukleových kyselin. S překvapením nyní bylo nalezeno, že je takovýto produkt možno připravit. Detaily přípravy, charakterisace a použití jsou popsány níže.

Metoda přípravy ultračisté kyseliny hyaluronové s kontrolovatelnou vysokou molekulovou hmotností zahrnuje stupně kultivace organismu produkujícího HA s negativním obsahem hyaluronidasy nebo u kterého je hyaluronidase inhibována, za podmínek dostatečných pro zvýšení HA obsahu, v kultuře, která by uvolňovala HA z buněk a čištění uvolněné HA tak, aby se odstranily veškeré proteiny a nukleové kyseliny.

Předmětem předloženého vynálezu je způsob přípravy hyaluronové kyseliny, který se vyznačuje tím, že se

- a) kultivuje organismus produkující kyselinu hyaluronovou vybraný ze skupiny zahrnující hemolytické streptokoky skupiny A a skupiny C, s výhodou Streptococcus equi, ve standardním kapalném médiu pro kultivaci organismů rodu Streptomyces do aerobních podmínek při teplotě od 30 do 40 °C,
- b) ze živného média se extrahuje kyselina hyaluronová a

- c) filtrací přes filtr, který váže proteiny, se odstraní proteiny.

Ve výhodném provedení se HA připravuje ze streptokoků skupiny C (jako je Streptococcus equi), s výhodou kultivovaném v médiu prostém vnějších proteinů, kde konečný produkt je sterilní preparátem s úzce kontrolovanou molekulovou hmotností obsahující méně než 1,25 mg/ml proteinu (s výhodou méně než 0,10 mg/ml) a méně než asi

45 $\mu\text{g/ml}$ nukleových kyselin s výhodou méně než 5 $\mu\text{g/ml}$) a který je použitelný jako náhrada synoviální kapaliny u savců.

Jak je patrné z příkladů uvedených níže, HA produkt podle vynálezu je odlišný od obchodně dostupných produktů MA v tom, že připraven z mikrobiálních zdrojů prostých hyaluronidas nebo s inhibovanou hyaluronidasou má úzce kontrolovanou molekulovou hmotnost a což je velmi důležité, je v podstatě prostý proteinů, nukleových kyselin a chondroitin sulfátu, které všechny jsou nežádoucí nečistotami produktů používaných pro náhradu živočišných kapalin. Výraz „v podstatě prostý“ použitý zde pro obsah proteinu a nukleových kyselin, znamená, že obsah proteinu v HA preparátu je menší než 1,25 mg/ml (s výhodou méně než 0,10 mg/ml) a obsah nukleové kyseliny je menší než asi 45 $\mu\text{g/ml}$ (s výhodou menší než 5 $\mu\text{g/ml}$). Výraz úzce kontrolovaná molekulová hmotnost znamená, že alespoň 98 % HA se pohybuje v průměrné vysoké molekulové hmotnosti (s výhodou od asi 2 000 000 do asi 4 000 000 a která je reprezentována v podstatě jedním symetrickým píkem molekulové hmotnosti při vysokotlaké kapalinové chromatografii popsané níže). Výraz „prostý hyaluronidas“ znamená, že u organismu není přítomno měřitelné množství extracelulární hyaluronidasy, schopné degradovat HA na malé molekuly. Výraz „inhibovaná hyaluronidasa“ znamená, že byl použit inhibitor, jako je zahřátí nebo použití inhibitorů enzymu a zabránilo se tak štěpení HA na menší molekuly.

V příkladech uvedených níže, čistota a účinnost HA připravené podle předloženého vynálezu byla prokázána a srovnána s dostupnými obchodními produkty použitím HA při náhradě tělních kapalin u koní. Je žádoucí, aby produkt mohl být také použit v kterékoli aplikaci u ostatních savců, včetně lidí, což znamená, že se musí použít vysoce čisté preparáty pro náhradu kapalin a pro ostatní účely, jako je kosmetika.

V určitých příkladech přípravy uvedených níže jsme použili známý organismus produkující HA ze skupiny S streptokoků (*Streptococcus equi*) a novou kultivační a čistící technikou bylo prokázáno, že je nyní možné získat ultračistý produkt kontrolované molekulové hmotnosti ve velmi vysokém výtěžku (např. v průměru 31 % hmot/hmot oproti 0,079 % hmot/hmot z koňských hřebínků), přičemž výhody vysoké čistoty a lepšího produktu s kontrolovanou molekulovou hmotností představují jasnou ekonomickou výhodnost. Vzorek kmenu *Streptococcus equi* použitý níže byl uložen v American Type Culture Collection, Rockville, MD 20 852 pod číslem A. T. C. C. číslo 39 506.

Jak bylo uvedeno výše, je dlouho známo, že HA je hlavní složkou tobolky u typů A a C streptokoků. Uvedení streptokokového organismu zobrazující umístění HA v tobolce

(hyaluronátová tobolka) bylo publikováno v práci Beachey a Stollerman, Trans. Assoc. Am. Physicians Phila., 85, 212 až 221 (1972).

Jak bylo ukázáno, HA tobolka je nejzevnější složka tvořící velkou část celé streptokokové buňky. Během růstu kultury streptokoků tato tobolka může být pozorována po vybarvení kultury indickým inkoustem, které vytvoří jasnou aureolu kolem každé buňky. Tímto postupem bylo stanoveno, že maximální produkce tobolky se získá z několika kmenů streptokoků pěstovaných v kontrolovatelných fermentačních systémech 4 až 6 hodin po začátku log fáze růstu. Během další log fáze a stacionární fáze se viditelná tobolka ztrácí. Je známo, že u některých kmenů streptokoků toto vymizení tobolky je způsobené enzymatickou degradací hyaluronidasou. Při dlouhodobých fermentačních studních (2 až 5 růstu) s alespoň jednou skupinou C streptokoků (*Strep. equi*) při kontrolovaném pH, teplotě, obsahu glukosy, bylo překvapivě nalezeno, že výtěžky HA se mohou podstatně zvýšit i když tobolky nejsou v kultuře viditelné. Z těchto studií se usuzuje, že tento kmen pravděpodobně nemá hyaluronidasu. Tak jestliže kmeny streptokoků neobsahující extracelulární hyaluronidasu se pěstují za kontrolovaných podmínek specifických pro produkci HA, pak výtěžky velmi čisté HA s vysokou specificitou molekulové hmotnosti jsou velké. Předpokládá se, že hlavním důvodem při takovéto přípravě HA je nepřítomnost hyaluronidasového enzymu.

Jak bylo uvedeno, předložený vynález se týká postupu pro přípravu ultračisté hyaluronové kyseliny s velkou molekulovou hmotností ve vysokém výtěžku z bakterií, jako jsou kmeny *Streptococcus* a způsobu použití kyseliny hyaluronové pro náhradu synoviální kapaliny u onemocnělých kloubů, aby se snížily vady a otoky těchto kloubů.

Podle nejlepšího příkladu se fermentace streptokoků skupiny C provádí při pH 7,0 a 7,2 24 hodin až 120 hodin při 37 °C. Specifická chemicky definovaná média použitá pro kultivaci jsou popsána v práci I. van de Rijn Infect. and Immun., 27, 444 až 448 (1980). Tato média jsou výhodná, neboť neobsahují žádné extracelulární proteiny, které by se musely odstraňovat v dalších purifikačních stupních. Dextrosa se přidává ve 24 hodinových intervalech a slouží jako zdroj uhlíku. Kultura se pěstuje za periodické kontroly pH, při kterém se upraví pH na hodnotu 7,6 po každém přidavku dextrosy. Asi 12 hodin před ukončením se kontrolovala pH přerušit a hodnota se nechá poklesnout na 6,5 až 6,8, kdy kultura přestává růst. To umožňuje lepší centrifugaci a poněkud vyšší výtěžky kyseliny hyaluronové.

Při zpracování se ke kultuře přidává alespoň 0,01 % sodné soli laurylsulfátu nebo ekvivalentního aniontového detergentu, aby se uvolnila kyselina hyaluronová z buněk.

Asi po 15 minutách se kultura s přidaným detergentem titruje za účelem vyvločkování přidávkem vhodného množství 10% roztoku hexadecyltrimethylamoniumbromidu nebo ekvivalentního neiontového detergentu.

Obecně se přidává asi 100 ml a 400 ml druhého neiontového detergentu na 10 l kultury s aniontovým detergentem, aby došlo k vyvločkování HA. Asi po jedné hodině maximálního vyvločkování HA a aniontového detergentu se sraženina oddělí centrifugací nebo filtrací přes síto. Tato sraženina se pak rozpouští v 2M CaCl_2 v asi 1/10 až 1/20 původního objemu. Rozpouštění se provádí asi 6 hodin při 4 až 30 °C. Vzniklá suspenze se centrifuguje nebo filtruje na sítích, aby se odstranila sraženina, která obsahuje buněčné nečistoty a oba detergenty. Supernatant se pak extrahuje 2 objemy vhodného alkoholu (95 % EtOH nebo 99 % isopropanol jsou nejvýhodnější). Vytvoří se želatinová sraženina, která se asi po 1 hodině centrifuguje nebo filtruje na sítích. Sraženina se rozpouští přes noc při 40 °C až 10 °C v deionisované destilované vodě (asi 1/10 až 1/20 původního objemu). Suspense se centrifuguje nebo filtruje na sítích, aby se odstranila sraženina. K supernatantu se přidá 1 % NaCl (hmot/obje) a rozpustí. Pak se přidají 2 objemy vhodného alkoholu a HA se znovu vysráží. Tato sraženina se nechá sedimentovat alespoň 1 hodinu, načež se jímá centrifugací nebo filtrací na sítích.

Rozpuštění HA ve vodě se pak provádí přidáním 1,0 % NaCl a přidává se alkohol pro vysrážení v postupně menších objemech (1/20 až 1/100 původního objemu), až vodný roztok HA je čirý. To obvykle vyžaduje alespoň čtyři další stupně vysrážení alkoholem. Následující postup shrnut níže.

Následující postup pro extrakci bakteriální kyseliny hyaluronové:

1. růst organismu *Streptococcus*,
2. přidavek 1 ml 10% sodné soli laurylsulfátu na 1 l média,
3. přidavek 10 % hexadecyltrimethylamoniumbromidu 10 až 40 ml/l,
4. jímání sraženiny,
5. rozpouštění v 2M CaCl_2 ,
6. jímání supernatantu,
7. přidání 2 objektů alkoholu (vysrážení HA, určitého podílu nukleových kyselin a proteinu),
8. jímání sraženiny
9. rozpouštění sraženiny v destilované vodě,
10. vyhození nerozpustné sraženiny,
11. jímání supernatantu,
12. přidání 1 % NaCl a 2 objektů alkoholu (vysrážení HA),
13. jímání sraženiny,
14. rozpouštění v destilované vodě,
15. vyhození nerozpustného podílu jímání supernatantu,

16. přidání 1 % NaCl a 2 objemů alkoholu (vysrážení HA),

17. jímání sraženiny,

18. rozpouštění v destilované vodě,

19. vyhození sraženiny jímání supernatantu,

20. filtrace — typ vázající protein (např. nitrocelulosa) odstraní se část z minerálního zbylého množství proteinu),

21. přidání 1 % NaCl a 2 objemů alkoholu (vysrážení HA),

22. jímání sraženiny,

23. rozpouštění v 0,15 M fosfátovém pufru pH 7,2

24. úprava na 1 % HA spektrofotometrickým testem,

25. sterilisace 0,1 % betapropiolaktonem 4 až 6, 24 až 48 hodin,

26. hydrolyza betapropiolaktonu 37 °C 24 až 48 hodin,

27. naplnění stříkaček.

Konečné stupně přípravy produktu mohou zahrnovat promytí 95% ethanolem a 99% acetonem a následující vysušení ve vakuu. Vysušená kyselina hyaluronová se resuspenduje v 0,15 M pufru fosforečnanu sodného koncentrace 1 %. Produkt se může sterilizovat přes 0,45 μ filtr nitrocelulosového typu a/nebo se sterilizuje v konečném objemu 0,1 % betapropiolaktonu. Sterilisace betapropiolaktonu se provádí při 4 °C 24 až 48 hodin, načež se provede hydrolyza betapropiolaktonu při 37 °C po dobu 24 až 48 hodin. Konečný produkt obsahuje 10 mg/ml HA v 0,15 M pufru fosforečnanu sodného. Jestliže se provedou tyto stupně, získá se HA nejvyšší čistoty ve vysokém výtěžku (> 99,90 % HA).

Jako příklad výtěžku je možno uvést, že v průměru 10 l fermentační tank s *Strep. equi* produkuje 5 g až 7 g suché hmotnosti buněk a 1,0 g až 2,5 g suché hmotnosti HA. Výtěžek je tedy mezi 14,3 % až 50 % (hmot/hmot). Výtěžky HA z extrakce kohoutích hřebínků podle USA patentu 4 141 973 se pohybují kolem 0,079 %.

Je nutno poznamenat, že poslední stadium filtrace přes vhodný filtr vázající proteiny (např. nitrocelulosový filtr) je nutný, aby se odstranila reaktivita konečného HA produktu. Ostatní typy filtrů (jednoduchý celulosový a acetátcelulosový) nedostatečně odstraňují reaktivitu HA, jak bylo pozorováno při injekčním testu do kloubů koní. Důvodem je odstranění minoritních množství reaktivního proteinového materiálu zbývajícího v HA.

Čistota kyseliny hyaluronové z bakterií byla hodnocena kolorimetrickým proteinovým testem. UV spektrometrií, vysokotlakou kapalinovou chromatografií a gelovou elektroforezou na deskách. První pokusy zahrnují kvantifikaci proteinových nečistot BIO RAD proteinovým testem. Tato metoda může detekovat množství proteinu kolem 200 μg /ml. Tabulka I zahrnuje výsledky testů 1,0%

vodných roztoků kyseliny hyaluronové extrahované ze čtyř různých fermentačních

tanků *Strep. equi*.

Tabulka I

Výsledky BIO RAD proteinových testů

Vzorek	O. D. při 595 nm	Koncentrace proteinu
ferm. 1	0,00; 0,000	< 200 $\mu\text{g/ml}$
ferm. 2	0,00; 0,010	< 200 $\mu\text{g/ml}$
ferm. 3	0,00; 0,005	< 200 $\mu\text{g/ml}$
ferm. 4	0,00; 0,005	< 200 $\mu\text{g/ml}$

Podle údajů z tohoto testu, obsah proteinů v 1% roztoku připravovaném z bakteriální kyseliny hyaluronové může být až 0,001 procent.

Druhá metoda stanovení obsahu proteinů, peptidů a/nebo aminokyselin je absorpce v UV záření při 280 nm. Jako kontrolní standard byla použita známá koncentrace albuminu z hovězího séra. Tabulka II srovnává tyto výsledky s UV absorpcí stejných roztoků při 257 nm. Absorpce při 257 nm reprezentuje znečištění nukleotidy nebo nukleovými kyselinami, jako jsou DNA a RNA. Je třeba uvést, že spektrofotometrická absorpce při 280 nm detekuje více proteinových znečištěnin než test BIO RAD. Roztoky bakteriální HA v koncentraci 1,0 % obsahují

nanejvíc 0,12 % znečištěnin, které absorbují při 280 nm. Vzhledem k tomu, že stejné roztoky neobsahují znečištěniny nukleových kyselin, čistota se pohybuje v rozmezí alespoň 99,88 %. V tomto ohledu je zajímavé, že analýza aminokyselin obdobně extrahované HA ukazuje na přítomnost méně než 0,04 % proteinu. To by znamenalo, že čistota HA je až 99,96 %. Pro srovnání čistota obchodně dostupné kyseliny hyaluronové

z kohoutích hřebínků (HYARTIL[®] dostupného od firmy Pharmacia nebo HYALOVET[™] dostupného od Trans Bussan) je podle našich testů v rozmezí od 99,78 % do 99,86 %.

Tabulka II

Znečištění 1% roztoku kyseliny hyaluronové proteiny a nukleovými kyselinami — měřeno UV spektrofotometrií

Vzorek	UV absorpce		Koncentrace	
	0,0 při 280 nm	0,0 při 257 nm	proteiny mg/ml	nukleové kyseliny mg/ml
ferm. 1	0,45	0,00	0,66	0,0
ferm. 2	0,83	0,00	1,22	0,0
ferm. 3	0,75	0,00	1,10	0,0
ferm. 4	0,47	0,00	0,69	0,0
Miles Labs. (kohoutí hřebínky)				
nízká čistota	1,16	1,31	1,70	48,5
Pharmacia				
HYARTIL [®]	0,91	1,63	1,33	60,3
Trans Bussan	1,27	> 2,0	1,86	> 74 > 300
HYALOVET [™]		1/30 zřed. = 0,27		

Pro stanovení čistoty bakteriální HA byly provedeny další studie. Účinnost dvou čistících postupů s alkoholem byla hodnocena spektrofotometricky při 280 nm, 257 nm a 195 nm. Absorpce při 195 nm reprezentuje skutečnou absorpci HA a je lineární vzhledem ke koncentraci HA. Tabulka III uvádí

dí optické hustoty, zatímco tabulka IV převádí veškeré hodnoty na koncentrace proteinů, nukleové kyseliny a HA. Dva poslední fermentační tanky poskytují bakteriální kyselinu hyaluronovou čistoty 99,99 % při použití 95% EtOH nebo 99% isopropylalkoholu pro extrakci.

Tabulka III

Čištění roztoků kyseliny hyaluronové — UV absorpce

Čistící stupeň	UV absorpce (konečný 1 %) UV absorpce					
	O. D. při 280 nm		O. D. při 257 nm		O. D. při 195 nm	
	ETOH	isopropyl- alkohol	ETOH	isopropyl- alkohol	ETOH	isopropyl- alkohol
1. H ₂ O roztok	0,480	0,442	0,456	0,341	0,740	0,643
2. H ₂ O roztok	0,215	0,288	0,204	0,230	1,00	0,898
3. H ₂ O roztok	0,215	0,155	0,191	0,182	1,76	1,82
4. H ₂ O roztok	0,078	0,070	0,140	0,120	1,90	1,82

Tabulka IV

Důkaz čištění — koncentrace proteinů a nukleových kyselin ve srovnání s koncentrací kyseliny hyaluronové

Čistící stupeň	protein mg/ml		koncentrace nukleová kyselina μg/ml		hyaluronová kyselina mg/ml	
	ETOH	isopropyl- alkohol	ETOH	isopropyl- alkohol	ETOH	isopropyl- alkohol
1. H ₂ O roztok	0,52	0,66	17,3	12,8	4,0	3,5
2. H ₂ O roztok	0,32	0,44	7,6	8,5	5,4	4,9
3. H ₂ O roztok	0,32	0,22	7,0	6,9	9,3	9,8
4. H ₂ O roztok {konečný roztok 1 % v H ₂ O	0,08	0,10	5,0	4,3	10,2	9,8

Gelová elektroforesa na desce byla použita pro další analýzu různých 1% preparátů hyaluronové kyseliny, uvedených v tabulce II na obsah nukleových kyselin. Tato technika může odlišovat DNA od RNA. Byla použita 0,8 % agarosa s nízkou vnitřní osmosou obsahující 2 μg/ml ethidiumbromidu ve spojení s krátkovlnným UV zářením pro rozlišení nukleových kyselin po elektroforese. DNA s daleko větší molekulovou hmotností zůstává blízko startu, zatímco RNA migruje s frontou pufru. Dvacetpět mikrolitrových vzorků se elektroforesuje 18 hodin při 90 voltech v Canalco, Slab Gel aparatuře. Výsledky ukazují, že ve čtyřech preparátech podle předloženého vynálezu nebo v

komerčním produktu HYARTIL ^(*) není přítomno detekovatelné množství nukleových kyselin. Naopak produkt HyalovetTM vykazuje signifikantní množství nukleových kyselin ve formě RNA.

Vysokotlaká kapalinová chromatografie byla použita pro analýzu molekulové hmotnosti různých HA preparátů. Toto je nová a přesnější metoda než je viskosimetrie uvedená a použitá v patentu 4 141 973. Až dosud pouze jedna kolona (Waters Micro Bondagel/E — High A) byla použita pro stanovení molekulové hmotnosti. Není možné chromatografovat vodné standardy v požadovaném rozmezí molekulové hmotnosti spolu s testovanými vzorky, aby se tak stanovila přesná molekulová hmotnost. Avšak stanovili jsme relativní molekulové hmotnosti na podkladě retenčních časů látek e-

luovaných z kolony. Teoreticky tímto postupem se nejprve eluují píky vyšší molekulové hmotnosti. Kolona má retenční časy v rozmezí 10 minut s minimálním a maximálním rozsahem molekulové hmotnosti 15 000 a 7 000 000. Obrázky 1 až 4 ukazují záznamy z vysokotlaké kapalinové chromatografie preparátů připravených v prvních čtyřech fermentačních tancích. Analýza preprátů

Hyaluron firmy Miles, HYARTIL ^(*) firmy Pharmacia a HyalovetTM firmy Trans Bussan jsou patrné na obrázcích 5 až 7. Byly stanoveny retenční časy píků a jejich inflexí a z nich byla vypočtena relativní molekulová hmotnost vztahená na lineární vztahy mezi molekulovou hmotností standardů (15 000 až 7 000 000) a retenčním časem (0 až 10 minut). Tyto relativní molekulové hmotnosti jsou uvedeny v tabulce V. Jak je patrné z obrázků 1 až 4 vysokotlaké kapalinové chromatografie, HA připravená podle předloženého vynálezu se eluuje v podstatě jako jeden téměř symetrický pík s vysokou molekulovou hmotností (průměrná molekulová hmotnost vyšší než asi 2 milióny). Obrázky 1 až 4 dále ukazují, že alespoň 98 % obsahu HA je v rozsahu tohoto jednoho píku. Takováto kontrolovaná distribuce vysoké molekulové hmotnosti není u současných komerčních produktů, jak je patrné z obrázků 5 až 7. Obrázek 5 (dosavadní stav techniky # 1) ukazuje záznam z vysokotlaké kapalinové chromatografie produktu HA Hyaluron firmy Miles. Obrázek 6 (dosavadní

stav techniky # 2) ukazuje analýzu produktu Hyalovet a obrázek 7 (dosavadní stav techniky # 3) ukazuje analýzu produktu

HYARTIL [®]. Předpokládá se, že tato přesná kontrola molekulové hmotnosti ko-

nečného produktu může být způsobena jednoduchostí extrakčního postupu vyžadujícího minimálně stupně způsobující štěpení, jakož i nepřítomností hyaluronidasy, která by degradovala HA s vysokou molekulovou hmotností.

Tabulka V

Relativní molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové v různých preparátech

Vzorek	Rozsah	Průměr
fermentor 1	2,2 až 3,9	2,8
fermentor 2	2,5 až 4,0	3,8
fermentor 3	1,7 až 2,8	2,4
fermentor 4	1,1 až 3,9	2,6
Hyaluron	0,015 až 3,0	0,015
HYALOVET	< 0,010 až 3,7	0,015, 1,8, 3,7
HYARTIL [®]	< 0,010 až 3,8	1,9

Jak bylo uvedeno výše, relativní rozmezí molekulové hmotnosti HA nalezené u bakteriální HA je úzké s převahou (93 %) v rozsahu kolem 1 100 000 nebo 2 220 000 a 4 000 000. Při použití stejné metody produkt Hyalovet obsahuje tři odlišné rozsahy molekulové hmotnosti 2 700 000, 1 700 000 a

300 000. Konečně produkt HYARTIL obsahuje rozsah molekulové hmotnosti od < 10 000 do 3 700 000. Jak je patrné, produkt

HYARTIL [®] obsahuje nejširší rozsah různých molekulových hmotností.

Z různých výše popsaných analytických metod vyplývá, že HA extrahovaná z bakterií jednoduchou metodou, je čistší než tři obchodní produkty připravené buď z koňských hřebínků nebo pupečních šňůr. Tyto produkty se připravují komplexním postupem, který poskytuje pouze výtěžek 0,079 % HA. Naopak HA extrahovaná ze streptokoků může dosáhnout výtěžky až 50 % hmot/hmot.

Nábrada tekutiny kloubů

Kyseliny hyaluronové připravená z bakterií, jak je popsána výše, byla testována na reaktivitu v tibiotarsálních a radialkarpálních kloubech koňů. Pro měření reaktivity preparátu kyseliny hyaluronové po intra-artikulární injekci koňům byl vyvinut následující klinický test s uvedenými indexy.

Testovací protokol byl následující:

1. Odbadnutí normálního pohybu kloubu, který má být injekčně ošetřen. Určení indexů kulhavosti od 0 do 5 podle následujících definic.

Index kulhavosti:

- 0 = žádné kulhání
- 1 = slabé kulhání — mírné
- 2 = pozorovatelné kulhání — mírné
- 3 = nápadné kulhání
- 4 = vážné kulhání — neochota k pohybu nebo k nošení břemene
- 5 = neschopnost nést břemeno. Při padnutí zvíře není schopno vstát.

2. Podání sedativa koni (např.

Rompun [®]).

3. Vyholení chlupů kolem místa kloubu, kam má být aplikována injekce.

4. Stanovení indexu otékání podle následujících definic.

Index otékání:

- 0 = bez otoku
- 1 = nic nápadného — hmatatelná kapalina
- 2 = mírně patrný otok — hmatatelná kapalina
- 3 = patrný otok na vnějšku kloubu
- 4 = vážný otok v místě injekce
- 5 = vážný otok zahrnující i místa kolem kloubu

5. Krejčovským metrem se změří obvod kloubu bezprostředně kolem osy třetího metatarsálního (tibiotarsálního) kloubu nebo bezprostředně blízko k vypouklině vedlejší karpální kosti (karpální kloub).

Změří se přesný obvod kloubu v milimetrech před a po injekci. Vypoučítává se rozdíl mezi obvody každý den po injekci. Jestliže rozdíl je větší než 1,0 cm, pak se přesné měření přidá k ostatním hodnotám indexu a stanoví se klinický index.

6. Injekční stříkačkou 3 ml a injekční jehlou 20 až 22 ga. $\times$ 2,5 cm se před injekcí odebere kapalina kloubu (1,0 až 2,0 ml).

7. Injekují se 2,0 ml 1 % preparátu kyseliny hyaluronové, u něhož má být stanovena reaktivita. Pro tuto injekci se použije 3,0 mililitru injekční stříkačka se stejnou jehlou (pouze se vymění jehla), jaká byla použita pro odejmutí kapaliny kloubu. Tento postup je prováděn proto, aby se pokud možno snížilo trauma kloubu.

8. Na injekční místo se aplikuje 1 až 3 minuty digitální tlak, aby se preventivně zabránilo zpětnému výtoku velmi viskózní kyseliny hyaluronové.

9. Pozorování a měření se provádí 4 po sobě následující dny po injekci a pak sedmý den.

10. Klinický index (CI) se vypočítává následujícím způsobem:

Celkový index kulhavosti (TLI) = součet indexů denní kulhavosti

Celkový index otékání (TSI) = součet indexů denní kulhavosti + součet měření obvodu kloubu větších než 1,0 cm

$$CI = TLI + TSI$$

11. Proveďte se interpretace.

Samotné injekce způsobují trauma s vývojem otoků a kulhání. To bylo prokázáno řadou hodnocení kloubů, do kterých byl injikován fosfátový pufr (PBS) a kloubů, z kterých byla pouze odebrána kapalina. Klinický index (CI) vypočtený z těchto traumatizovaných kloubů se pohyboval u změřených 56 kloubů mezi 0 až 18,7. Avšak průměrné hodnoty CI u tří separátních studií traumatizovaných kloubů ukázaly, že individuální variace byly 0,7; 5,3 a 3,4. Předpokládá se tedy, že se mohou očekávat průměrné hodnoty CI 6,0 nebo méně u alespoň z 10 kloubů. 6,0 nebo méně přiznali jako přijatelnou pro vyhodnocování testu reaktivity preparátů HA pomocí kloubů koní. Jakýkoli produkt, u něhož průměrná hodnota CI u 10 kloubů byla větší než 6,0, byl označen jako nepřijatelný. Použitím těchto kritérií byly testovány veškeré HA preparáty. Výsledky jsou shrnuté v tabulce VI.

Tabulka VI

Vyhodnocování preparátů hyaluronové kyseliny testem reaktivity kloubů u koní.

Preparát	Číslo kloubu	Průměrný CI	Přijatelnost přípravku
mikrobiologický zdroj HA	14	4,6	přijatelný
filtrovaný přes nitrocelulózu	13	5,5	přijatelný
mikrobiologický zdroj HA	11	16,4	nepřijatelný
nefiltrovaný	6	17,4	nepřijatelný
dosavadní stav techniky # 1, čištěný a filtrovaný	10	6,2	nepřijatelný

Mikrobiální zdroj HA uvedený v tabulce V byl získán z fermentorů 1 až 4 popsaných výše. Stojí za zmínku, že tento materiál je přijatelný pro injekce do kloubů po filtraci přes nitrocelulózu, ale nepřijatelný před filtrací. Naopak materiál podle dosavadního stavu techniky # 1 (viz obr. 5), je na hranici přijatelnosti i po filtraci přes nitrocelulózu. Reaktivní proteinový obsah je evidentně příliš vysoký a nelze jej odstranit filtračním stupněm, při kterém se váže protein.

Stejný klinický index CI je možno použít pro hodnocení léčení onemocnělých kloubů pomocí HA. Při tomto testovacím systému se klinické symptomy vyvolají v kloubech intraartikulární injekcí úplné nebo neúplné Freundovy přísady. Tato přísada produkuje nejprve akutní a pak chronický patologický stav kloubu charakterizovaný extrémní kulhavostí a otékáním, které se samostatně nezlepší během dvou měsíců.

Některé tyto studie účinnosti byly provedeny s pokusnými vzorky bakteriální HA.

Pokusy byly provedeny tak, aby se hodnotil účinek odstranění části kapaliny kloubu z patologických kloubů vyvolaných přísa-

dou a náhradou této kapaliny bakteriální HA. Tyto pokusy byly provedeny jak u kloubů s akutním stavem (injekce HA během tří dnů po Freundově injekci) a s kloubu s chronickým stavem (HA bylo injikováno 12 až 34 dnů po Freundově injekci). Hodnocení klinického indexu se počíná dnem po injekci přísady a pokračuje čtyři dny po injekci HA, načež se provádí týdenní pozorování po tři týdny. Obrázky 8 a 9 ukazují výsledky během 30denní periody.

Obrázek 8 reprezentuje akutní situaci. Nultý den se odečte, upraví na hodnotu 7 relativní škály indexů tak, že srovnání je lépe patrné. Nultý den reprezentuje třetí den po injekci Freundova činidla s kloubem v akutním stavu. Obrázek 8 pak ukazuje změny v klinickém indexu pro prvních 30 dnů po injekci HA z fermentorů 1 a 2 a dosavadního stavu techniky # 1 po dalším čištění. Tyto výsledky se srovnávají s obdobným kloubem s injikovatelnou přísadou, který však nebyl léčen (kontrola). Je patrné, že u kontrolních koní se stav kontinuálně zhoršuje i čtvrtý den po Freundově injekci, dříve než se ukáže určité zlepšení sa-

mo o sobě. Avšak toto zlepšení nedosáhne výchozí hladiny třetího dne a od čtvrtého dne zůstává stejné. Toto je typický obraz pro přechod do chronické patologie. Signifikantní zlepšení akutních symptomů bylo pozorováno po injekci HA.

Chronická situace je znázorněna na obr. 9. Koně, kterým byla injikována Freundova úplná nebo neúplná přísada 12 až 34 dnů před léčením HA, mohou sloužit jako vlastní kontroly, neboť tito koně byli v stabilizovaném stavu alespoň sedm dní před nulovým dnem. Kontrolní linie reprezentuje tyto hladiny kontrolního indexu. Znovu okamžité klinické zlepšení je patrné po léčení HA. Delší pozorovací termíny těchto konů ukazují, že zlepšení vede k ustálení původního stavu. Očekává se tedy, že je nutné více než jedno léčení.

Při studiu se vyskytl jeden kůň s onemocněním kloubu s nespecifickým stavem. Jak je patrné z obr. 10, do kloubu byly aplikovány dvě injekce bakteriální HA během 30 dnů. V tomto případě nulému dni byla přiřazena hodnota 10, aby byla patrná úplná léčebná odpověď. Okamžité zlepšení bylo pa-

trné jak po první, tak po druhé injekci HA. Zlepšení po první injekci bylo následováno návratem k patologickému stavu, indikovaném pouze otokem. Po druhé injekci HA byl otok odstraněn a nevrátil se během tří měsíců po léčení.

Z dat uvedených výše je patrné, že ultračistá bakteriální HA je nereaktivní u koňských kloubů a je účinná při odstraňování kulhání a/nebo otékání onemocněných kloubů. Vzhledem k tomu, že preparát bakteriální HA popsáný výše je čistší než kterýkoli komerčně dostupný produkt, včetně těch použitelných při oftalmologických léčeních, je vysoce pravděpodobné, že tyto HA preparáty se mohou též použít pro náhradu očního moku během oční chirurgie. Je schopný nahradit jakékoli jiné použití HA z kohoutích hřebínek nebo pupečních šňůr.

Podle výše uvedených příkladů se dá předpokládat, že odborník může nalézt řadu variací při obměně metod podle předloženého vynálezu. Výše uvedené příklady jsou formulovány pouze pro objasnění vynálezu a rozsah vynálezu je omezen pouze následujícími body předmětu vynálezu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

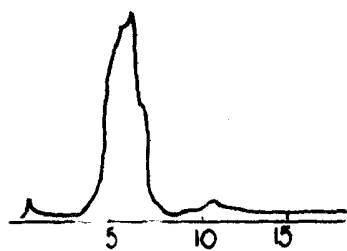
1. Způsob přípravy hyaluronové kyseliny vyznačující se tím, že se

a) kultivuje organismus produkující kyselinu hyaluronovou vybraný ze skupiny zahrnující hemolytické streptokoky skupiny A a skupiny C, s výhodou *Streptococcus equi*, ve standardním kapalném médiu pro kultivaci organismů rodu *Streptomyces* za aerobních podmínek při teplotě od 30 do 40 °C,

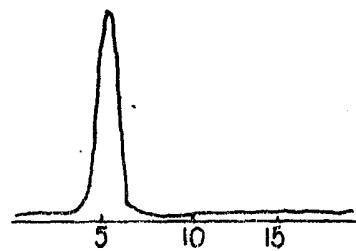
b) ze živného média se extrahuje kyselina hyaluronová a

c) filtrací přes filtr, který váže proteiny, se odstraní proteiny.

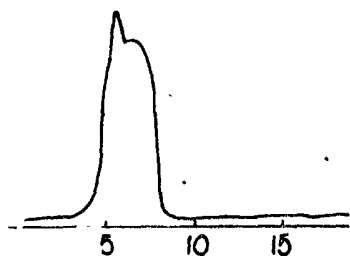
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že extrakční stupeň b) je následován čisticím postupem zahrnujícím opakované srážení alkoholem a rozpouštění ve vodě a následující filtrací přes nitrocelulózu až obsah proteinů v preparátu je menší než 1,25 mg/ml a koncentrace nukleové kyseliny je menší než 45 µg/ml.



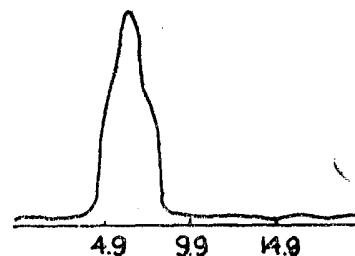
Obr. 1



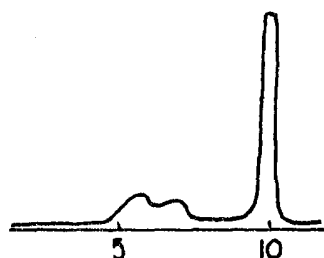
Obr. 2



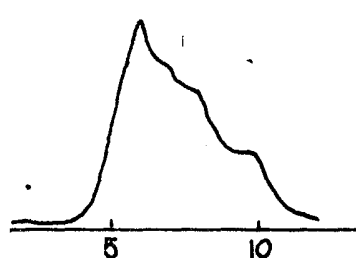
Obr. 3



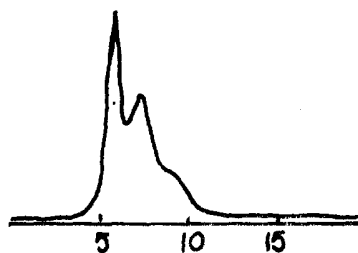
Obr. 4



Obr. 5

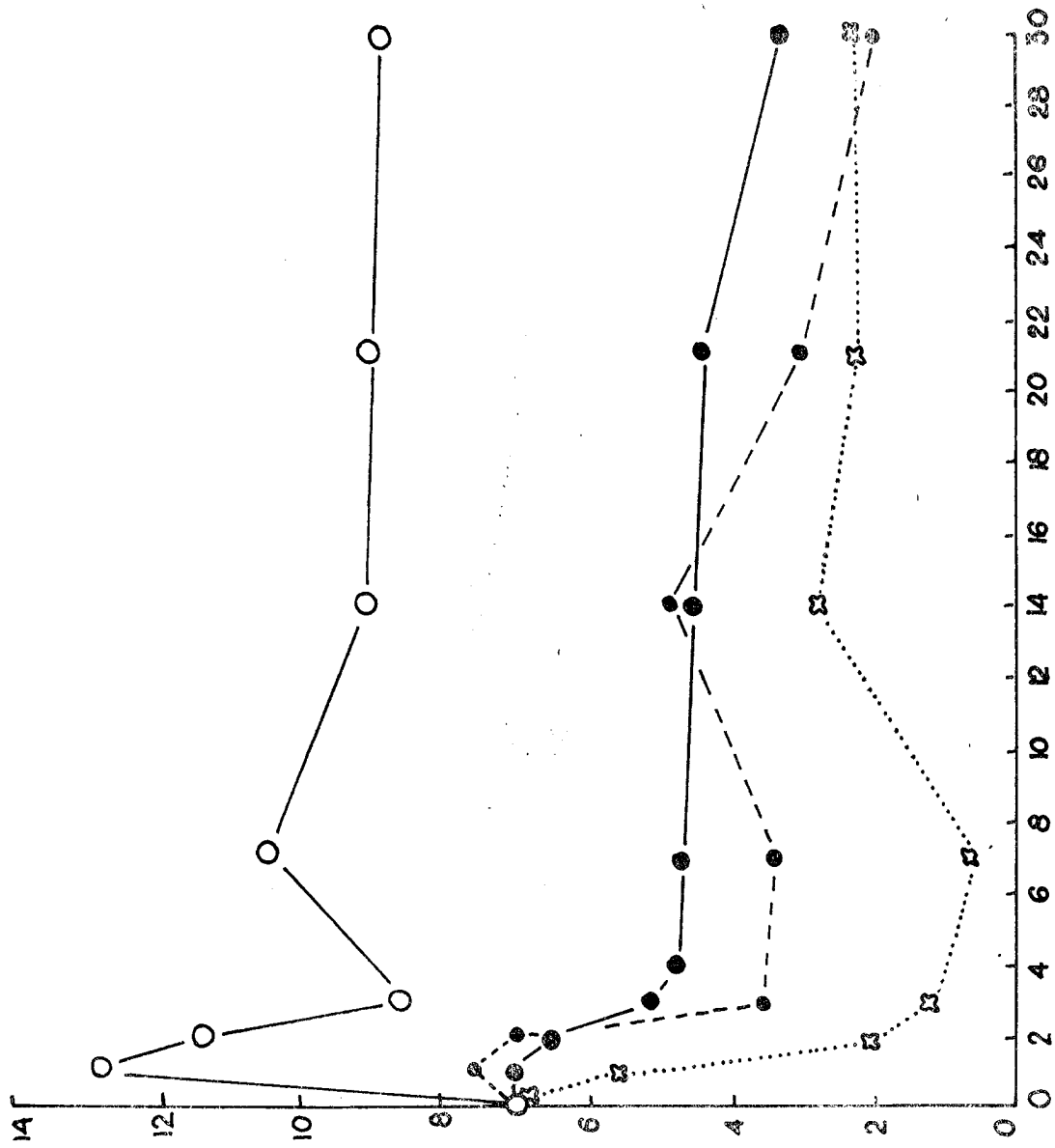


Obr. 6

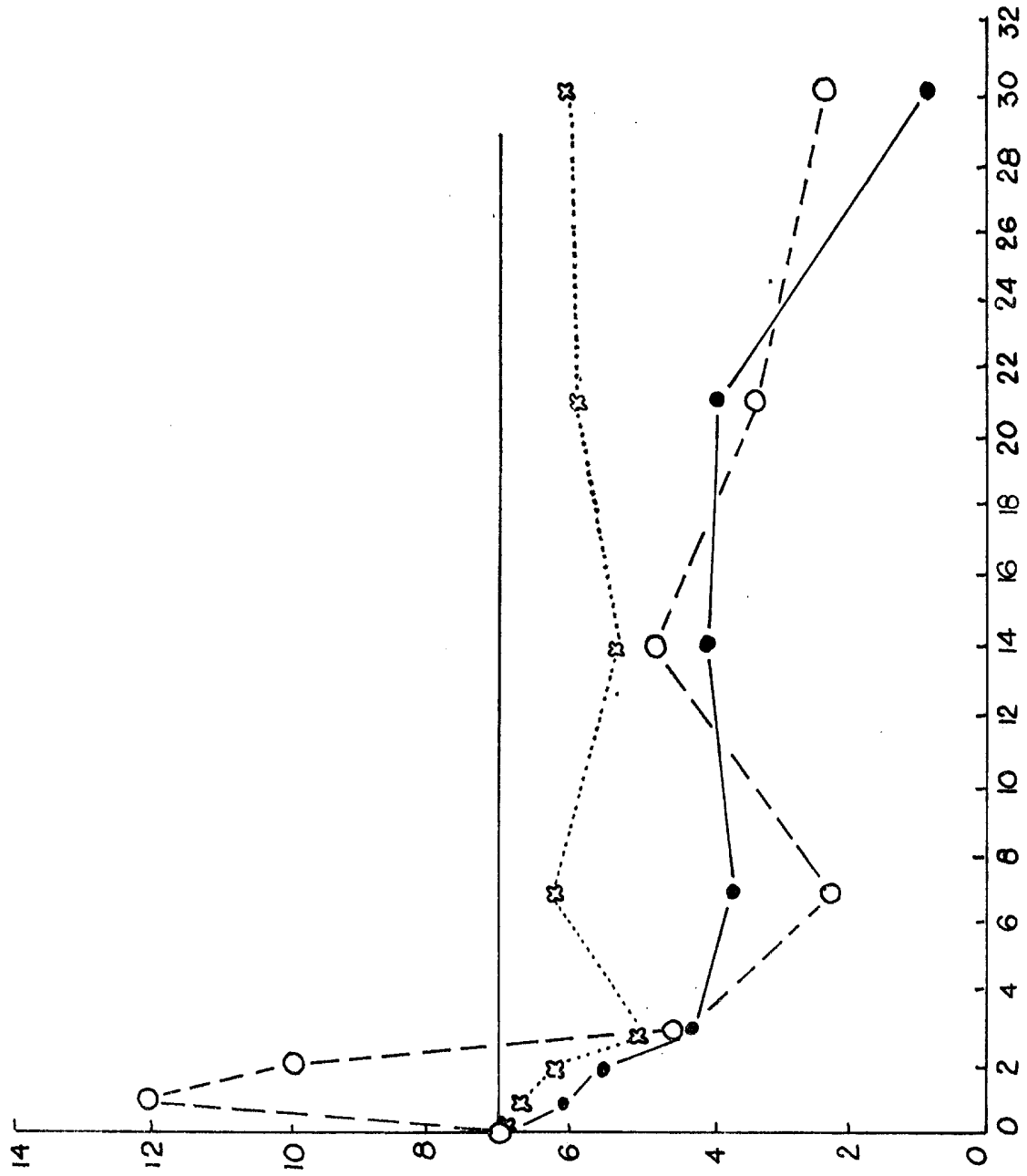


Obr. 7

Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10

