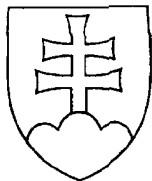


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **1063-2001**
- (22) Dátum podania prihlášky: **27. 1. 2000**
- (24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **7. 7. 2008**
Vestník ÚPV SR č.: **7/2008**
- (31) Číslo prioritnej prihlášky: **154/99**
- (32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **28. 1. 1999**
- (33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **CH**
- (40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 4. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **04/2002**
- (47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **27. 6. 2008**
- (62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
- (67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
- (86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IB00/00082**
- (87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/44925**
- (96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(11) Číslo dokumentu:

286327

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2006):

C12P 19/00

(73) Majiteľ: **TRB Chemedica SA, Vouvry, CH;**

(72) Pôvodca: **Carlino Stefano, Monthey, CH;**
Magnette Francois, Marsens, CH;

(74) Zástupca: **JUDr. Eva Bušová, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob čistenia kyseliny hyalurónovej s vysokou molekulovou hmotnosťou**

(57) Anotácia:
Spôsob čistenia kyseliny hyalurónovej s vysokou molekulovou hmotnosťou nie menšou ako $0,5 \times 10^6$ Daltonov pochádzajúcej z biologického zdroja, ktorý zahŕňa stupeň úpravy pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcu z biologického zdroja na hodnotu v rozmedzí od 1,7 do 3,3, stupeň diafiltrácie uvedeného vodného roztoku pri uvedenej hodnote pH cez filter s veľkosťou pórov v rozmedzí od limitu separácie nominálnej molekulovej hmotnosti 100 000 Daltonov do $0,45 \mu\text{m}$ a stupeň odstránenia buniek z vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcu z biologického zdroja.

SK 286327 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu čistenia kyseliny hyalurónovej s vysokou molekulovou hmotnosťou alebo jej soli.

Doterajší stav techniky

Kyselina hyalurónová je mukopolysacharid biologického pôvodu, v prírode dosť rozšírený. Je napríklad známe, že kyselina hyalurónová je obsiahnutá v živočíšnych tkanivách ako v pupočnej šnúre, synovialnej tekutine, v sklovci, v kohútíom hrebeni a rôznych spojovacích tkanivách ako v koži a v chrupavke.

Chemicky patrí kyselina hyalurónová medzi glykózaminoglykány a obsahuje striedajúce sa a opakujúce sa jednotky D-glukurónovej kyseliny a N-acetyl-D-glukózamínu tvoriacich lineárny reťazec s molekulovou hmotnosťou až do 13×10^6 Daltonov.

Výraz „kyselina hyalurónová s vysokou molekulovou hmotnosťou“ používaný v prihláške tohto vynálezu znamená kyselinu hyalurónovú s molekulovou hmotnosťou, ktorej hodnota nie je menšia ako asi $0,5 \times 10^6$ Daltonov.

Výraz „kyselina hyalurónová“ uvádzaný v opise vynálezu aj v patentových nárokoch môže znamenať bez rozlišovania tak kyselinu hyalurónovú vo svojej kyslej forme, ako aj znamenať jej soľ, napríklad natrium-hyaluronát, kálium-hyaluronát, magnézium-hyaluronát, kalcium-hyaluronát alebo ďalšie.

Kyselina hyalurónová s vysokou molekulovou hmotnosťou je viskózna a je schopná si zachovávať gélovitý stav, má lubrikačné účinky a zabraňuje invázii baktérii a zadržiava vodu.

Vďaka týmto vlastnostiam kyselina hyalurónová umožňuje zachovávať tonicitu a elasticitu kože.

V literatúre existujú obsiahle údaje o farmaceutickom použití kyseliny hyalurónovej alebo jej soli.

Pretože kyselina hyalurónová je neimunogénna zlúčenina a má viskózno-elastické a hydrofilné vlastnosti, používa sa už niekoľko rokov ako náhrada sklovca alebo klbového mazu, alebo ako nosné médium v očnej chirurgii, ako je opísané napríklad v US-A-4 141 973, Balasz.

V klbových mazoch pôsobí roztok kyseliny hyalurónovej ako klzný prostriedok poskytujúci bunkám ochranné prostredie, a preto sa používa na liečbu zápalu kolenných klbov.

V EP-A-0 781 547, Chemedica S. A., je opísaný oftalmický prípravok obsahujúci natrium-hyaluronát na použitie v očnej chirurgii.

V EP-A-0 719 559, Chemedica S. A. sú opísané viskózne roztoky natrium-hyaluronátu vhodné ako masokovacie tekutiny pri terapeutickom fotokeratektómii pomocou „excimer-lasera“.

V EP-A-0 875 248, Chemedica S. A. je opísané použitie kyseliny hyalurónovej alebo niektorej z jej farmaceuticky prijateľných solí na prípravu vodných roztokov vhodných ako tekutiny na intraartikulárne výplachy.

V EP-A-0 698 388, Chemedica S. A. je opísaný oftalmický prípravok slúžiaci ako náhrada slz, ktorý obsahuje hyaluronát ako prostriedok na zvýšenie viskozity.

Vďaka vysokej hydrofilnosti je možné kyselinu hyalurónovú použiť tiež v kozmetických produktoch ako v pleťových vodách a krémoch.

Na farmaceutické použitie kyseliny hyalurónovej alebo jej soli sa vyžaduje, aby uvedené zložky boli vo vysoko čistej forme.

Kyselinu hyalurónovú možno extrahovať a získať prečistením napríklad z pupočnej šnúry, z kohútich hrebenkov alebo zo streptokokov skupiny A a C, ako je opísané napríklad v US-A-4 141 973, Balasz a v US-A-5 559 104, Romeo a kol.

Prípravu kyseliny hyalurónovej s použitím streptokokov po prvýkrát opísali Forbes a kol., v roku 1937 (J. Biol. Chem., 118,61 (1937)) a neskôr bolo preukázané, že kyselina hyalurónová získaná zo zvieracích zdrojov je totožná s kyselinou hyalurónovou získanou z mikrobiologických zdrojov.

Spôsoby prípravy kyseliny hyalurónovej z mikrobiologických zdrojov sú založené na vlastnostiach streptokokov, že ich bunková stena obsahuje ako hlavnú zložku kyselinu hyalurónovú.

Uvedené mikroorganizmy sú schopné transformovať glukózu obsiahnutú v ich životnom prostredí na D-glukurónovú kyselinu a N-acetyl-G-glukózamín a ako sekundárny metabolit produkovať kyselinu hyalurónovú na tvorbu svojej ochrannej steny.

Biosyntéza kyseliny hyalurónovej je opísaná napríklad v US-A-4 897 349, Swann a kol.

Na získavanie kyseliny hyalurónovej alebo jej sodnej soli z mikrobiologických zdrojov vo farmaceutickej čistote je známych viac spôsobov.

Napríklad v US-A-4 780 414, Nimrod a kol., US-A-4 517 295, Bracke a kol. a v US-A-5 563 051, Ellwood a kol., sú uvedené spôsoby získavania kyseliny hyalurónovej kontinuálnou fermentáciou baktérií rodu *Streptococcus* s nadväzným prečistením až na farmaceutickú čistotu.

Predsa len vo všetkých uvedených procesoch spôsoby čistenia kyseliny hyalurónovej zahrnujú vyžrážanie kyseliny hyalurónovej z mikrobiologického prostredia s použitím veľkého množstva organických rozpúšťadiel, ako je etanol, acetón, izopropanol atď.

Sú tiež známe niektoré spôsoby čistenia kyseliny hyalurónovej z mikrobiologických zdrojov s použitím kvartérnych amóniových solí (US-A-4 517 295, Bracke a kol.) alebo s použitím aniónových alebo kationových povrchovo aktívnych prostriedkov (US-A-5 316 926, Brown a kol.)

Opísané spôsoby sú v celosti zložité, čo vedie k vysokej cene produktov.

Sú tiež známe spôsoby čistenia, kde roztok kyseliny hyalurónovej sa spracuje diafiltráciou s použitím filtra s nominálnou hodnotou separácie molekulovej hmotnosti 10 000, 20 000 alebo 30 000 Daltonov, opísané napríklad v US-A-5 563 051, Ellwood a kol., a v US-A-4 517 295, Bracke a kol.

Vzhľadom na nízku hodnotu separačného limitu molekulovej hmotnosti možno skôr uvedené diafiltračné spôsoby použiť iba na odstránenie veľmi malých molekúl a diafiltrovaný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú musí byť ďalej spracovaný spôsobmi zahrňujúcimi rôzne spôsoby zrážania, čo vedie k tomu, že uvedené spôsoby zostávajú i naďalej zložité.

Cieľom predloženého vynálezu je poskytnúť spôsob získavania kyseliny hyalurónovej alebo jej soli vysokej molekulovej hmotnosti majúcej farmaceuticky prijateľnú čistotu z biologických zdrojov, obzvlášť z mikrobiologických zdrojov vo vysokom výťažku, pri pomerne nízkych nákladoch a výhodne bez použitia organických rozpúšťadiel alebo bez pridania ďalších prostriedkov.

Podstata vynálezu

Uvedený cieľ sa dá podľa vynálezu doceliť spôsobom čistenia kyseliny hyalurónovej s vysokou molekulovou hmotnosťou z biologického zdroja charakterizovaného tým, že zahŕňa nasledujúce stupne:

a) úprava pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcou z biologického zdroja na pH v rozmedzí 1,7 až 3,3 s nadväznou diafiltráciou uvedeného roztoku pri rovnakej hodnote pH s použitím filtra s veľkosťou pórov s nominálnym separačným limitom molekulovej hmotnosti od 100 000 Daltonov do 0,45 μm ;

b) odstránenie buniek z vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcou z biologického zdroja, kde uvedený stupeň sa vykoná pred stupňom (a) alebo po stupni (a);

c) sterilizácia.

Uvedeným spôsobom, zahrňujúcim stupeň diafiltrácie pri pH v rozmedzí od 1,7 do 3,3 a stupeň odstránenia buniek, sa tak dá výhodne prečistiť kyselina hyalurónová s vysokou molekulovou hmotnosťou z biologického zdroja a najmä z mikrobiologického zdroja a získať tak kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou alebo jej soľ vo farmaceuticky prijateľnej čistote a s vysokým výťažkom.

V stupni (a) spôsobu podľa vynálezu sa kyselina hyalurónová spracuje diafiltráciou s použitím filtra nominálneho limitu separácie molekulovej hmotnosti alebo veľkosti pórov umožňujúceho recirkuláciu kyseliny hyalurónovej a prechod všetkých ostatných zložiek obsiahnutých v roztoku alebo v živnej pôde filtrom.

Spôsob podľa vynálezu možno vykonať s použitím akéhokoľvek biologického zdroja kyseliny hyalurónovej.

Spôsobom podľa vynálezu možno kyselinu hyalurónovú vo farmaceuticky prijateľnej čistote výhodne pripraviť bez sprievodných stopových množstiev organických rozpúšťadiel alebo ďalších pridávaných zložiek, pretože spôsob čistenia podľa vynálezu nezahŕňa zrážanie organickými rozpúšťadlami alebo ďalšími prostriedkami, ale kyselina hyalurónová zostáva v celom priebehu uvedeného spôsobu v roztoku.

Ďalšie ciele, vlastnosti a výhody vynálezu budú zrejme z nasledujúceho podrobného opisu.

Spôsobom podľa vynálezu je možné prečistiť kyselinu hyalurónovú z akéhokoľvek biologického zdroja až na farmaceuticky prijateľnú čistotu.

Napríklad vodný roztok kyseliny hyalurónovej obsahujúci kyselinu hyalurónovú s veľkou molekulovou hmotnosťou určený na prvotné spracovanie buď v stupni (a) podľa vynálezu, alebo v stupni (b) podľa vynálezu môže byť vodný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú získaný extrakciou pupočnej šnúry, kohútich hrebienkov alebo iných zdrojov.

Predsa len vo výhodnom vyhotovení podľa vynálezu je vodný roztok kyseliny hyalurónovej z mikrobiologického zdroja obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou určený najprv na spracovanie buď v stupni (a) podľa vynálezu, alebo v stupni (b) podľa vynálezu vodnej živnej pôdy, ktorá obsahuje kyselinu hyalurónovú z mikrobiologického zdroja.

Mikrobiologický zdroj je výhodný mikroorganizmus rodu *Streptococcus* produkujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou a ešte výhodnejšie sa mikrobiologický zdroj zvolí zo skupiny zahrňujúcej *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* a *Streptococcus pyogenes*.

Vodné živné pôdy obsahujúce kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou možno pripraviť ktorýmkoľvek spôsobmi v odbore dobre známymi, zahrnujúcimi fermentáciu kultúry *Streptococcus* vo vhodnom vodnom médiu a za vhodných podmienok za tvorby kyseliny hyalurónovej s vysokou molekulovou hmotnosťou. Uvedené spôsoby sú opísané napríklad v US-A-4 780 414, Nimrod a kol., US-A-5 563 051

Ellwood a kol. alebo v US-A-5 316 916, Brown a kol.

Spôsob prípravy vodnej živnej pôdy obsahujúcej kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou sa podľa vynálezu dá vykonať napríklad nasledovne:

Na konci obvykle používaného fermentačného spôsobu sa vodná živná pôda s pH asi 7,4 obsahujúca kyselinu hyalurónovú prevedie do nádrže so systémom na automatickú reguláciu teploty.

Teplota sa potom udržiava na hodnote v rozmedzí od 15 °C do 25 °C, výhodne na 20 °C.

Vodný roztok kyseliny hyalurónovej alebo živná pôda obsahujúca kyselinu hyalurónovú sa potom spracováva spôsobom čistenia podľa vynálezu.

Odstánenie všetkých proteínov a ďalších rozpustných zložiek obsiahnutých vo vodnom roztoku sa potom vykoná v stupni (a) diafiltráciou roztoku získaného z biologického zdroja s pH v rozmedzí od 1,7 do 3,3 s použitím filtra s veľkosťou pórov v rozmedzí od separačného limitu nominálnej molekulovej hmotnosti 100 000 Daltonov do 0,45 µm.

Predpokladá sa, že keď sa pH roztoku kyseliny hyalurónovej upraví na hodnotu v rozmedzí od 1,7 do 3,3, dôjde k vzniku určitého typu zasieťovania, kde molekuly kyseliny hyalurónovej vytvoria sieť, ktorá sa za podmienok iných hodnôt pH rozpadne.

V rozmedzí hodnôt pH od 1,7 do 3,3 táto sieť neprechádza filtrom s veľkosťou pórov v rozmedzí od separačného limitu nominálnej molekulovej hmotnosti 100 000 Daltonov do 0,45 µm, zatiaľ čo ostatné zložky prechádzajú filtrom, čo umožňuje separáciu kyseliny hyalurónovej od všetkých rozpustených zložiek obsiahnutých v roztoku.

V stupni (a) sa pH vodného roztoku výhodne upraví na hodnotu v rozmedzí od 2,0 do 2,7 a potom sa vykoná diafiltrácia pri uvedenej hodnote pH.

Ešte výhodnejšie sa v stupni (a) pH vodného roztoku upraví na hodnotu v rozmedzí od 2,3 do 2,7 a potom sa vykoná diafiltrácia pri uvedenej hodnote pH.

V stupni (a) sa pH výhodne upraví vodným roztokom HCl.

V prvom výhodnom prevedení podľa vynálezu sa stupeň (b) zahrnujúci odstránenie buniek vykoná až po stupni (a) zahrnujúcom diafiltráciu, kde pH vodného roztoku alebo živnej pôdy obsahujúcej kyselinu hyalurónovú z biologického zdroja sa najprv upraví na hodnotu v rozmedzí od 1,7 do 3,3, výhodne na hodnotu v rozmedzí od 2,5 do 2,6, výhodne vodným roztokom kyseliny chlorovodíkovej.

Pri uvedených hodnotách pH sa vodný roztok alebo živná pôda obsahujúca kyselinu hyalurónovú prevedie na viskózne-elastický vodný roztok alebo živnú pôdu obsahujúcu kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou v zasieťovanom stave.

Takto pripravený vodný roztok alebo živná pôda obsahujúca kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou sa potom podrobí diafiltrácii, výhodne diafiltrácii s priečnym tokom za udržiavania hodnoty pH na konštantnej hodnote počas celého diafiltračného stupňa.

Zvlášť výhodné je, keď filter použitý v stupni (a) rafinačného spôsobu podľa prvého výhodného prevedenia vynálezu má veľkosť pórov 0,2 µm.

V uvedenom stupni (a) zahrnujúcom diafiltráciu sa viskózne-elastický vodný roztok alebo živná pôda obsahujúca kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou čerpá do filtračnej komory s priečnym tokom s vhodným počtom filtračných vložiek s veľkosťou pórov v rozmedzí od separačného limitu nominálnej molekulovej hmotnosti 100 000 Daltonov do 0,45 µm výhodne s veľkosťou pórov 0,2 µm za prívodu apyrogénnej destilovanej vody do zásobníka obsahujúceho viskózne-elastický roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou rovnakou rýchlosťou ako sa odvádza filtrát, aby bol zachovaný konštantný objem.

V stupni (a) rafinačného procesu podľa prvého výhodného prevedenia vynálezu sa viskózne-elastický roztok alebo živná pôda obsahujúca kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou výhodne diafiltruje tak dlho, pokiaľ odstraňovaný filtrát nemá absorbanciu (optickú hustotu, OD) pri vlnovej dĺžke 280 nm rovnakú alebo nižšiu ako 0,02. V tomto prípade by absorbancia filtrátu pri uvedenej vlnovej dĺžke mala byť sledovaná počas celého diafiltračného procesu.

Podľa uvedeného prvého výhodného prevedenia vynálezu, po stupni (a), zahrnujúcom diafiltráciu, nasleduje stupeň (b), zahrnujúci odstránenie buniek, výhodne stupeň (b), ktorý zahrnuje odstredovanie na odstránenie všetkých buniek alebo proteínov obsiahnutých v diafiltrovanom roztoku alebo živnej pôde.

V prípade mikrobiologického zdroja môže stupeň odstredovania zahŕňať napríklad úpravu pH diafiltrovanej živnej pôdy na pH na rozmedzí od 3,5 do 5,0, výhodne na 4,0 a potom odstredenie diafiltrovanej vodnej živnej pôdy za získania supernatantu obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou.

Výhodne sa hodnota pH diafiltrovanej živnej pôdy upraví vodným roztokom NaOH. Predsa len je možné použiť aj iné alkalické roztoky.

Podľa uvedeného prvého výhodného prevedenia po stupni (b) zahrnujúcom odstránenie buniek sa vykoná sterilizačný stupeň (c).

5 Podľa druhého výhodného prevedenia spôsobu podľa vynálezu sa stupeň (b) zahrnujúci odstránenie buniek vykoná pred stupňom diafiltrácie (a).

V druhom výhodnom prevedení sa stupeň (b) odstránenie buniek výhodne vykoná v diafiltračnom stupni s priečnym tokom.

10 V diafiltračnom stupni odstraňovania buniek (b) sa pH vodného roztoku kyseliny hyalurónovej alebo živnej pôdy získanej z biologického zdroja najprv upraví na pH 3,5 výhodne vodným roztokom HCl, a potom sa získaný vodný roztok alebo živná pôda diafiltruje pri uvedenom pH s použitím filtra s veľkosťou 0,2 μm .

15 V diafiltračnom stupni (b) odstraňovania buniek sa vodný roztok alebo živná pôda obsahujúca kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou čerpá do filtračnej komory s priečnym tokom, ktorá má vhodný počet filtračných vložiek s veľkosťou pórov 0,2 μm za prívodu sterilnej apyrogénnej destilovanej vody do zásobníka obsahujúceho vodný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou, rovnakou rýchlosťou akou sa odvádza filtrát, aby bol zachovaný konštantný objem.

Pri uvedenej hodnote pH umožňuje filter s veľkosťou pórov 0,2 μm recirkuláciu buniek a prechod kyseliny hyalurónovej filtrom.

20 V stupni (b) rafinačného spôsobu podľa druhého výhodného prevedenia sa vodný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú výhodne s vysokou molekulovou hmotnosťou diafiltruje až do dosiahnutia prídavku 10 ekvivalentných objemov apyrogénnej destilovanej vody.

V stupni (a) uvedeného druhého výhodného prevedenia sa pH vodného roztoku kyseliny hyalurónovej v podstate bez buniek získanej v stupni (b) najprv upraví na 1,7 až 3,3, výhodne na 2,4, výhodne pomocou vodného roztoku HCl.

25 Pri uvedenej hodnote pH sa vodný roztok kyseliny hyalurónovej prevedie na veľmi viskózne-elastický roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú v zasietenom usporiadaní.

Takto získaný vodný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou sa potom diafiltruje, výhodne v procese s priečnym tokom, pričom hodnota pH sa udržiava na konštantne vyššie uvedenej hodnote počas celého priebehu diafiltrácie.

30 V stupni (a) uvedeného rafinačného spôsobu podľa vynálezu podľa druhého výhodného prevedenia sa použije filter so separačným limitom nominálnej molekulovej hmotnosti 300 000 Daltonov.

35 V uvedenom diafiltračnom stupni (a) sa viskózne-elastický vodný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou čerpá do filtračnej komory s vhodným počtom filtračných vložiek s veľkosťou pórov v rozmedzí od separačného limitu nominálnej molekulovej hmotnosti 100 000 Daltonov do 0,45 μm , výhodne s nominálnym separačným limitom molekulovej hmotnosti 300 000 Daltonov, za zahustenia a prívodu apyrogénnej sterilnej destilovanej vody do zásobníka obsahujúceho viskózne-elastický roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou rovnakou rýchlosťou ako sa odvádza filtrát, aby bol zachovaný konštantný objem.

40 V stupni (a) rafinačného spôsobu podľa druhého výhodného prevedenia vynálezu sa viskózne-elastický vodný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou výhodne diafiltruje až do dosiahnutia prídavku 15 ekvivalentných objemov apyrogénnej sterilnej destilovanej vody. Filtrát sa potom odstráni.

Pri použití druhého výhodného prevedenia vynálezu je výhodné, že je vynechané odstredzovanie.

45 Podľa uvedeného druhého prevedenia za stupňom (a) zahrnujúcom diafiltráciu nasleduje stupeň (c) zahrnujúci sterilizáciu.

Sterilizačný stupeň v spôsobe podľa vynálezu sa výhodne vykoná filtračnou sterilizáciou.

Podľa vynálezu je možné filtračnú sterilizáciu vykonať jej štandardným spôsobom.

50 Podľa uvedeného prvého prevedenia sa stupeň sterilizácie filtráciou vykoná úpravou pH supernatantu získaného v stupni (b) odstredzením na hodnotu 7,0 a nasledujúcou filtráciou supernatantu cez filter s veľkosťou pórov 0,2 μm .

Podľa uvedeného druhého prevedenia sa stupeň sterilizácie filtráciou vykoná úpravou pH diafiltrovateľného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú získaného v stupni (a) na hodnotu 7,0 a následnou filtráciou supernatantu cez filter s veľkosťou pórov 0,2 μm .

55 V uvedených dvoch výhodných prevedeniach sa pH výhodne upraví pomocou vodného roztoku NaOH. Je možné použiť aj iné vodné alkalické roztoky.

Potom je možné sterilný roztok zahustiť s použitím filtra so separačným limitom nominálnej molekulovej hmotnosti 5 000 až 10 000 Daltonov.

Po zahutení je možné sterilizovaný roztok vysušiť vymrazením, pričom sa získa kyselina hyalurónová alebo jej soli vo forme suchého prášku.

Kyselina hyalurónová alebo jej soľ pripravená spôsobom čistenia podľa vynálezu má farmaceuticky prijateľnú čistotu a jej výťažok v uvedenom procese je asi 70 - 90 % hmotnostných vzhľadom na obsah kyseliny hyalurónovej v roztoku suroviny.

Kyselina hyalurónová alebo jej soľ, pripravená spôsobom čistenia podľa vynálezu, je pozoruhodná neprítomnosťou pyrogénnych zložiek a tým, že nemá zápalové účinky.

Kyselina hyalurónová alebo jej soľ, pripravená spôsobom čistenia podľa vynálezu, obsahuje od 90 % do 95 % hmotnostných kyseliny hyalurónovej obsahujúcej D-glukurónovú kyselinu a N-acetyl-D-glukózamín v pomere 1 : 1, od asi 3 % do 5 % hmotnostných vody, menej ako 0,2 % hmotnostných proteínov, menej ako 0,3 % hmotnostných nukleových kyselín a menej ako 0,3 % hmotnostných neutrálneho cukru.

Spôsob podľa vynálezu je veľmi jednoduchý a je veľmi výhodný z ekonomického a z ekologického hľadiska, pretože nezahŕňa použitie iných prostriedkov ako HCl alebo NaOH.

Pri použití spôsobu čistenia podľa vynálezu získaná kyselina hyalurónová alebo jej soľ neobsahuje žiadne stopy organických rozpúšťadiel.

Nasledujúce príklady prevedenia spôsobu prípravy kyseliny hyalurónovej s vysokou molekulovou hmotnosťou alebo jej soli s farmaceuticky prijateľnou čistotou podľa vynálezu sú uvedené len na znázornenie vynálezu a žiadnym spôsobom neobmedzujú rozsah vynálezu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príprava vodnej živnej pôdy obsahujúcej kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou z mikrobiologického zdroja.

Bunky *Streptococcus equi* sa kultivujú pri teplote 37 °C vo vhodnom médiu nasledujúceho zloženia:

glukóza.....	60 g,
Soytone	15 g,
extrakt z kvasníc	5 g,
dihydrogenfosforečnan draselný.....	2,5 g,
síran horečnatý heptahydrát.....	1,2 g,
prečistená apyrogénna voda.....	1 000 ml.

Desať litrov média sa vysterilizuje a inokuluje s 1 - 2 % kultúry *Streptococcus equi* s optickou hustotou (OD) asi 7 stanovenej pri vlnovej dĺžke 650 nm.

Počas fermentácie sa pH vodnej živnej pôdy automaticky udržiava na hodnote 7,4 (prídavky NaOH 5 mol/l). Vykonáva sa vzduchovanie v dávke 1 objemu vzduchu na jeden objem média za minútu, a počas celej fermentácie sa živná pôda premiešava rýchlosťou 250 ot./min.

Za 20 hodín sa živná pôda upokojí a prevedie sa do vhodnej nádrže majúcej objemovú kapacitu 50 litrov.

Spôsob čistenia podľa prvého výhodného prevedenia vynálezu

Hodnota pH živnej pôdy pripravenej opísaným spôsobom sa za kontinuálneho miešania upraví na 2,5 pomocou HCl (6 mol/l) a získa sa tak veľmi viskóznou vodná živná pôda, ktorá má vzhľad hustej kvapkovitej tekutiny.

Táto vodná živná pôda sa potom čerpá do filtračnej komory s priečnym tokom, ktorá má tri filtračné vložky 0,2 µm umiestnené na sebe. Použijú sa filtračné vložky SARTOCON cassette, Mod. No. 302 186 07 06 W-SG vyrábané firmou SARTORIUS s veľkosťou pórov 0,2 µm.

Na počiatku zavedenia vodnej živnej pôdy do filtračného systému sa ventil na odvod filtrátu uzavrie, aby vodná živná pôda mohla niekoľko minút recirkulovať a docielila sa stabilita systému a systém sa zbavil bublín obsiahnutých v systéme s recirkulujúcou tekutinou.

Potom sa ventil na odvod filtrátu otvorí a do nádrže obsahujúcej vodnú živnú pôdu sa začne zavádzať rovnakou rýchlosťou, ako sa odvádza filtrát sterilnej apyrogénnej destilovanej vody, aby sa zachoval konštantný objem vodnej živnej pôdy. Vstupný tlak sa udržiava na hodnote v rozmedzí 0,1 MPa až 0,3 MPa (1 až 3 bar) výhodne 0,2 MPa (2 bar).

Diafiltrácia sa ukončí, keď absorbancia filtrátu pri vlnovej dĺžke 280 nm dosiahne hodnotu 0,012 (OD). Filtrát sa odstraňuje.

Hodnota pH diafiltrovanej živnej pôdy sa potom upraví na 4 pomocou roztoku NaOH (5 mol/l) a potom sa živná pôda odstreďuje pri 9 000 ot./min. a 15 °C v odstredivke s chladením.

Potom sa hodnota pH supernatantu upraví na 7,0 roztokom NaOH (5 mol/l) a roztok sa sfiltruje cez filter s veľkosťou pórov 0,2 µm na sterilizáciu roztoku štandardným spôsobom.

Sterilný roztok sa potom lyofilizuje štandardným lyofilizačným spôsobom a získa sa tak hyaluronát sodný vo forme suchého prášku.

Výťažok kyseliny hyalurónovej podľa tohto príkladu je asi 85 - 87 % vzhľadom na obsah kyseliny hyalurónovej v roztoku obsahujúcom vstupnú surovinu. Pripravený produkt má nasledujúce parametre:

- obsah nátrium-hyaluronátu 96,5 %
- vnútorná viskozita (25 °C) = 2 100 ml/g (zodpovedajúcej molekulovej hmotnosti 1,7 x 106 Daltonov),
- obsah vody 3,1 %,
- obsah proteínov 0,08 %,
- obsah kyseliny nukleovej 0,01 %,
- obsah neutrálneho cukru 0,01 %.

Nátrium-hyaluronát s vysokou molekulovou hmotnosťou pripravený uvedeným spôsobom je vhodný na prípravu farmaceutických kompozícií.

Spôsob čistenia podľa druhého výhodného prevedenia vynálezu

Hodnota pH vodnej živnej pôdy objemu 5 litrov obsahujúcej kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pripravenú opísaným spôsobom z mikrobiologického zdroja sa za kontinuálneho miešania upraví na 3,5 pomocou HCl (6 mol/l) a na tejto hodnote pH sa udržiava v celom priebehu diafiltračného stupňa s priečnym tokom na odstránenie buniek.

Tento vodný roztok (5 litrov) sa potom čerpá do filtračnej komory s priečnym tokom vybavenej tromi filtračnými vložkami 0,2 µm umiestnenými na sebe. Použijú sa filtračné vložky SARTOCON cassette, Mod. No. 302 186 07 06 W-SG vyrábaných firmou SARTORIUS s veľkosťou pórov 0,2 µm.

Na počiatku zavádzania vodnej živnej pôdy do filtračného systému sa ventil na odvod filtrátu uzavrie, aby vodná živná pôda mohla niekoľko minút recirkulovať a docielila sa stabilita systému a systém sa zbavil bublín obsiahnutých v systéme s recirkulujúcou tekutinou.

Potom sa ventil na odvod filtrátu otvorí a do nádrže obsahujúcej vodnú živnú pôdu sa zavádza rovnakou rýchlosťou ako sa odvádza filtrát, sterilná apyrogénna destilovaná voda s celkovým objemom zodpovedajúcim 10 ekvivalentným objemom, aby sa zachoval konštantný objem vodnej živnej pôdy. Vstupný tlak sa udržiava na hodnote v rozmedzí 0,1 MPa až 0,3 MPa (1 až 3 bar) výhodne 0,2 MPa (2 bar).

Retenčná tekutina sa odstráni a filtrát (50 litrov) obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou zbavený buniek sa spracuje ďalej uvedeným spôsobom.

Hodnota pH získaného diafiltrovaného roztoku (50 litrov) obsahujúceho kyselinu hyalurónovú sa potom upraví na 2,4 za tvorby veľmi viskózneho roztoku a hodnota pH sa udržiava na skôr uvedenej hodnote počas celého diafiltračného procesu s priečnym tokom.

Táto vodná živná pôda (50 litrov) sa potom čerpá do filtračnej komory s priečnym tokom s tromi filtračnými vložkami 300 000 Daltonov umiestnenými na sebe. Použijú sa filtračné vložky SARTOCON cassette, Mod. No. 302 146 790 07 7E-SG vyrábané firmou SARTORIUS s veľkosťou pórov zodpovedajúcich 300 000 Daltonom.

Na počiatku zavádzania vodnej živnej pôdy do filtračného systému sa ventil na odvod filtrátu uzavrie, aby vodná živná pôda mohla niekoľko minút recirkulovať a docielila sa stabilita systému a systém sa zbavil bublín obsiahnutých v systéme s recirkulujúcou tekutinou.

Potom sa ventil na odvod filtrátu otvorí a vodná živná pôda sa zahustí na objem 7,5 litrov. Filtrát (42,5 litrov) sa odstráni.

Potom sa do nádrže obsahujúcej vodnú živnú pôdu zavedie rovnakou rýchlosťou ako sa odvedie filtrát, sterilná apyrogénna destilovaná voda s celkovým objemom rovnajúceho sa pätnástim ekvivalentným objemom, aby sa zachoval konštantný objem vodnej živnej pôdy. Vstupný tlak sa udržiava na hodnote v rozmedzí od 0,1 MPa do 0,3 MPa (1 až 3 bar.) výhodne 0,2 MPa (2 bar). Filtrát (116 litrov) sa odstráni.

Potom sa napájanie vodou ukončí a vodná živná pôda sa zahustí.

Hodnota pH zahusteného diafiltrovaného roztoku (4 litre) sa potom upraví na 7,0 pomocou NaOH (5 mol/l) a roztok sa sfiltruje cez statický filter s veľkosťou pórov 0,2 µm na sterilizáciu roztoku štandardným spôsobom sterilizácie filtráciou.

Sterilný roztok sa potom suší lyofilizáciou štandardným lyofilizačným spôsobom a vo forme suchého prášku sa tak získa hyaluronát sodný.

Výťažok v prevedení podľa uvedeného príkladu je asi 83 -85 % vztiahnutých na obsah kyseliny hyalurónovej v roztoku suroviny a produkt má nasledujúce parametre:

- obsah nátrium-hyaluronátu 97,0 %
- vnútorná viskozita (25 °C) = 2100 ml/g (zodpovedajúca molekulovej hmotnosti 1,7 x 106 Daltonov),
- obsah vody 2,9 %,
- obsah proteínu 0,08 %,
- obsah kyseliny nukleovej 0,01 %,
- obsah neutrálneho cukru 0,01 %.

Nátrium-hyaluronát s vysokou molekulovou hmotnosťou pripravený uvedeným spôsobom je vhodný na prípravu farmaceutických kompozícií.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob čistenia kyseliny hyalurónovej s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktorej hodnota nie je menšia ako $0,5 \times 10^6$ Daltonov pochádzajúcej z biologického zdroja vedúceho na získanie kyseliny hyalurónovej alebo jej soli s vysokou molekulovou hmotnosťou s čistotou prijateľnou na farmaceutické použitie, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa: a) stupeň úpravy pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcu z biologického zdroja na pH v rozmedzí 1,7 až 3,3 s nasledujúcou diafiltráciou tohto roztoku pri rovnakej hodnote pH s použitím filtra s veľkosťou pórov zodpovedajúcich separačnému limitu nominálnej molekulovej hmotnosti od 100 000 Daltonov do $0,45 \mu\text{m}$; b) stupeň odstránenia buniek z vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcu z biologického zdroja, kde uvedený stupeň sa vykoná buď pred stupňom (a), alebo po stupni (a); c) stupeň sterilizácie.
2. Spôsob čistenia podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že vodný roztok obsahujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúci z biologického zdroja, ktorý sa najprv spracuje buď v stupni (a), alebo v stupni (b) je vodná živná pôda obsahujúca kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcu z mikrobiologického zdroja.
3. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedeným mikrobiologickým zdrojom je mikroorganizmus rodu *Streptococcus* produkujúci kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou.
4. Spôsob podľa nároku 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedený mikroorganizmus rodu *Streptococcus* sa zvolí zo skupiny zahrnujúcej *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* a *Streptococcus pyogenes*.
5. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v stupni (a) sa hodnota pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou upraví na hodnotu v rozmedzí od 2,0 do 2,7 a potom sa roztok spracuje diafiltráciou pri uvedenej hodnote pH.
6. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v stupni (a) sa hodnota pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou upraví na hodnotu v rozmedzí od 2,3 do 2,7 a potom sa roztok spracuje diafiltráciou pri uvedenej hodnote pH.
7. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v stupni (a) sa hodnota pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou upraví vodným roztokom HCl.
8. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 7, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v stupni sterilizácie (c) sa sterilizácia vykoná filtračnou sterilizáciou.
9. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že po stupni sterilizácie (c) nasleduje stupeň lyofilizácie (d), v ktorom sa lyofilizáciou sterilizovaného roztoku získa kyselina hyalurónová alebo jej soľ vo forme suchého prášku.
10. Spôsob podľa nároku 9, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sterilizovaný roztok sa pred lyofilizáciou zahusťí.
11. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 10, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že stupeň odstránenia buniek (b) sa vykoná po stupni diafiltrácie (a).
12. Spôsob podľa nároku 11, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v stupni (a) sa hodnota pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou upraví na hodnotu v rozmedzí od 2,5 do 2,6 a potom sa roztok spracuje diafiltráciou pri uvedenej hodnote pH.
13. Spôsob podľa nároku 11 alebo 12, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že filter použitý v diafiltrácii v stupni (a) má veľkosť pórov $0,2 \mu\text{m}$.
14. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 11 až 12, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že roztok kyseliny hyalurónovej sa v stupni (a) diafiltruje tak dlho, pokiaľ odstraňovaný filtrát nemá hodnotu absorbancie (OD) pri vlnovej dĺžke 280 nm rovnakú alebo nižšiu 0,02.
15. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 11 až 14, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že stupeň (b) odstránenia buniek sa vykoná v stupni odstredovania.
16. Spôsob podľa nároku 15, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že stupeň odstredovania zahŕňa úpravu pH diafiltrovaného vodného roztoku získaného v stupni (a) na hodnotu pH v rozmedzí od 3,5 do 5,0 a odstredenie diafiltrovaného vodného roztoku za získania supernatantu obsahujúceho kyselinu hyalurónovú.
17. Spôsob podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že hodnota pH diafiltrovaného vodného roztoku získaného v stupni (a) sa upraví na 4,0.
18. Spôsob podľa nároku 17, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedená úprava hodnoty pH sa vykoná vodným roztokom NaOH.
19. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 15 až 18, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sterilizačný stupeň (c) je stupeň sterilizácie filtráciou zahrnujúci úpravu pH supernatantu získaného v stupni odstredovania (b) na hodnotu 7 a filtráciou supernatantu filtrom s veľkosťou pórov $0,2 \mu\text{m}$.

20. Spôsob podľa nároku 19, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedená úprava pH sa vykoná vodným roztokom NaOH.

21. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 10, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že stupeň (b) odstránenie buniek sa vykoná pred stupňom (a).

5 22. Spôsob podľa nároku 21, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že stupeň (b) odstránenie buniek je diafiltračný stupeň odstránenia buniek.

23. Spôsob podľa nároku 22, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že diafiltračný stupeň (b) odstránenie buniek zahŕňa úpravu pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou pochádzajúcu z biologického zdroja na hodnotu pH 3,5 a následnou diafiltráciou roztoku pri rovnakej hodnote pH s použitím filtra s veľkosťou pórov 0,2 μm .

10 24. Spôsob podľa nároku 23, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedená hodnota pH sa upraví vodným roztokom HCl.

25. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 24, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že filter použitý v diafiltračnom stupni (a) má veľkosť pórov zodpovedajúcich separačnému limitu nominálnej molekulovej hmotnosti 300 000 Daltonov.

15 26. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 25, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v stupni (a) sa pH vodného roztoku obsahujúceho kyselinu hyalurónovú s vysokou molekulovou hmotnosťou upraví na 2,4 a potom sa roztok diafiltruje pri rovnakej hodnote pH.

27. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 21 až 26, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sterilizačný stupeň (c) je stupeň sterilizácie filtráciou zahrnujúci úpravu hodnoty pH vodného roztoku získaného v stupni (a) diafiltráciou na hodnotu 7 a filtráciou tohto vodného roztoku filtrom s veľkosťou pórov 0,2 μm .

28. Spôsob podľa nároku 27, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uvedená úprava pH sa vykoná vodným roztokom NaOH.

25

Koniec dokumentu
