

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 883 110**

51 Int. Cl.:

B01D 61/14 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2018 PCT/IB2018/055291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019 WO19016699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2018 E 18749157 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.06.2021 EP 3655138**

54 Título: **Proceso para la purificación de ácido hialurónico**

30 Prioridad:

18.07.2017 IT 201700081449
18.07.2017 US 201762533798 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CORSA, VINCENZA y
CARPANESE, GIANCARLO

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 883 110 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

Proceso para la purificación de ácido hialurónico

5 **Campo de la invención**

10 El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido de alto peso molecular, lineal, aniónico y libre de grupos sulfato, que consiste en residuos alternados de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Está presente en la naturaleza en geles pericelulares, en la sustancia fundamental del tejido conectivo de los organismos vertebrados (del cual representa uno de los componentes principales), en el líquido sinovial de las articulaciones, en el humor vítreo y en el cordón umbilical. Por lo tanto, el AH juega un papel importante en el organismo biológico, sobre todo como soporte mecánico para las células de muchos tejidos como la piel, los tendones, los músculos y los cartílagos.

15 También es bien conocido que el AH, a través de sus receptores de membrana, en particular CD44, CD54 y CD168, modula muchos procesos diferentes relacionados con la fisiología y biología de la célula como, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación celular y angiogénesis, y que también realiza otras funciones como la hidratación de los tejidos y la lubricación de las articulaciones. Es absolutamente biocompatible y, gracias a sus muchas características específicas, se ha utilizado ampliamente durante años en varios campos que van desde la reparación de tejidos hasta la terapia de viscosuplementación, desde la medicina dermoestética hasta la cirugía endocular, desde la ingeniería de tejidos hasta la terapia celular y mucho más.

20 Las características químico-físicas y biológicas del AH están fuertemente correlacionadas con su peso molecular (PM, referido al PM promedio en peso calculado por el procedimiento de "viscosidad intrínseca"), que es extremadamente variable: generalmente se puede decir que el PM promedio en peso del AH varía de 20.000 a 25 13×10^6 Da aproximadamente, y la aproximación es imprescindible ya que cambia radicalmente dependiendo de la fuente y el procedimiento de producción y purificación utilizado para aislarlo.

Básicamente, existen dos procedimientos fundamentales para obtener AH:

30 producción a partir de fuentes animales: históricamente el AH se extrae de tejidos animales como el cordón umbilical, el humor vítreo o el líquido sinovial bovino y especialmente las crestas de gallo. La producción a partir de fuentes animales tiene numerosos límites, es costosa, por ejemplo, ya que se requieren numerosas etapas para eliminar varios tipos de impurezas (comenzando por la masa de residuos orgánicos después de la digestión del tejido de partida), ya que se necesitan etapas para garantizar la inactivación y 35 eliminación de cualquier agente contaminante (como virus) posiblemente presente en el material de partida, requiere la disponibilidad de cantidades considerables de materia prima y no proporciona grandes rendimientos;

40 fermentación de microorganismos: algunos microorganismos, en particular del género *Streptococcus* o *Pasteurella*, cuando se estimulan y/o modifican apropiadamente, son capaces de producir AH que se secreta en el caldo de cultivo del que se aísla mediante diferentes procesos, conocidos para las personas calificadas en el campo. También en este caso, se requieren numerosas etapas 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 no deseado. A pesar de estas limitaciones, este sigue siendo el procedimiento más desarrollado y utilizado para la producción de AH.

45 También se están estudiando nuevos procedimientos para la producción de AH por medio de biotecnología, mediante la transfección de genes que expresan la enzima AH-sintasa en células huésped adecuadas, como algunos géneros de *Bacillus* (*Megaterium* y *Subtilis*) y en *Escherichia coli*. Sin embargo, todos los procedimientos necesarios para la eliminación de cualquier residuo potencialmente dañino también son necesarios para estos procedimientos de producción.

50 En cualquier caso, independientemente del procedimiento utilizado, una etapa clave en la obtención de AH es obviamente la fase de extracción y purificación del polisacárido. Existen numerosos procedimientos conocidos, todos los cuales están extremadamente articulados y obviamente modulados en relación con las fuentes de partida para la obtención de AH.

55 En primer lugar, se deben eliminar los residuos de la fuente, por consiguiente, para la extracción del tejido animal, se realizan fases de digestión de las proteínas, y posteriores filtraciones, centrifugaciones y lavados; para la fermentación, se efectúan normalmente centrifugaciones y lavados progresivos. En cualquier caso, se obtiene una fracción líquida, de la que luego se aísla el polisacárido. A este respecto, el procedimiento más conocido y 60 ciertamente el más comúnmente aplicado, especialmente para AH de fuentes animales, es la precipitación con solvente: para líneas grandes, se utilizan concentraciones crecientes de solventes orgánicos (etanol, acetona) en la fracción líquida antedicha, provocando la precipitación del ácido hialurónico, que luego será purificado mediante subsiguientes solubilizaciones y precipitaciones.

65

Un sistema alternativo implica el uso de sales cuaternarias, por ejemplo, cetilpiridinio o cetiltrimetilamonio, con la función de complejar el polisacárido e inducir su precipitación. De nuevo, las subsiguientes solubilizaciones y precipitaciones son necesarias para obtener el producto terminado.

5 El desarrollo de técnicas también ha combinado las etapas clave descritas anteriormente con el fin de hacer que el proceso sea eficiente en términos de rendimiento y efectivo en términos de pureza; sin embargo, hasta la fecha todavía hay muchos, del orden de unos pocos cientos, eventos adversos reportados cada año a los organismos competentes (por ejemplo, la FDA), que se han producido especialmente después de la inyección de composiciones farmacéuticas a base de AH.

10 El ácido hialurónico se utiliza en una amplia variedad de campos y patologías: desde cosméticos (para administración tópica u oral) con acción hidratante hasta dermocosméticos tópicos con efecto lenitivo, desde dispositivos inyectables para la corrección de defectos cutáneos (intradérmicos), ya sean arrugas o cicatrices, a aplicaciones más estrictamente farmacológicas tales como uso intraarticular en patologías osteoarticulares, intraocularmente como sustituto del humor vítreo, intravesicalmente para cistitis intersticial, etc.

Mientras que para las aplicaciones cosméticas, que no tocan los tejidos dañados, un AH de grado cosmético (menos puro) resulta suficiente, es evidente que en el caso de las aplicaciones farmacéuticas, especialmente las aplicaciones inyectables y, más aún, las inyectables en cavidades cerradas (articulación y ojo), se requiere de un grado de pureza absoluta: debido a la naturaleza de los materiales de los que se extrae el ácido hialurónico, de hecho, puede haber en el producto terminado en forma residual, ácidos nucleicos, proteínas y/o toxinas bacterianas residuales de la pared celular de bacterias Gram-positivas (por ejemplo, del género *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*), como el ácido lipoteicoico ALT o bacterias Gram-negativas (como, por ejemplo, *Escherichia Coli*, *Pasteurella* y *Salmonella*), como lipopolisacárido LPS. Estos distintos tipos de contaminantes son capaces de provocar una importante reacción inflamatoria con la consiguiente liberación, tanto a nivel local como sistémico, de citocinas (en particular TNF e IL-1), capaces a su vez de inducir una reacción inflamatoria generalizada con repercusiones en el organismo entero, llegando, en los casos más graves, a formas de choque séptico.

30 De hecho, el ALT y el LPS son polímeros que constan de una porción lipídica y una porción sacárido capaces de desencadenar fuertes respuestas inmunes y, en las situaciones más graves, provocar artritis, nefritis, meningitis o provocar fiebre y choque con consecuencias que también pueden llegar a ser fatales. Esto explica el alto número de eventos adversos reportados, tal como se indicó anteriormente.

35 Además de esto, también se debe considerar que, como se mencionó anteriormente, el PM del AH es variable en relación con la fuente y al procedimiento de producción, y determina su campo de aplicación: los PM bajos, por ejemplo, se aplican en preparaciones dermatológicas o dermocosméticas (alrededor de 200 kDa, Connettivina®), mientras que para aplicaciones intraarticulares, se prefieren PM más altos (generalmente entre 700 y 1.800 kDa; Hyalgan®, Hyalubrix®, Orthovisc®), llegando a PM superiores a 1.500 kDa utilizados en cirugía cosmética o para aplicaciones intraoculares. En el contexto de un proceso de purificación, sin embargo, es fundamental eliminar las fracciones de AH con un PM inferior a 30.000 Da, para lo cual se ha demostrado ampliamente un fuerte efecto inflamatorio (EP0138572), que es absolutamente indeseable, independientemente del tipo de aplicación. Esto significa que, en un proceso de purificación industrial de AH, se deben evaluar y controlar varios factores:

45 el rendimiento del proceso: es fundamental extraer la máxima cantidad posible de AH de la fuente de producción seleccionada;
 conveniencia industrial: el mejor producto debe ser obtenido con el mínimo desperdicio de materiales utilizados (reactivos, solventes, etc.), produciendo la menor cantidad posible de residuos a desechar y en el menor tiempo posible;
 50 el grado de pureza: el producto obtenido debe estar libre de cualquier contaminante y también de las fracciones de AH con un PM < 30.000 Da, conocido por ser capaz de desencadenar una cascada inflamatoria.

55 El grado de pureza está obviamente relacionado con la precisión de las etapas de purificación. En el estado de la técnica se conocen numerosos intentos de resumir estos requisitos. Entre los muchos, se puede recordar lo siguiente, de manera esquemática:

60 EP0138572: purificación de AH de crestas de gallo mediante, entre otras, etapas de ultrafiltración, la adición de sales cuaternarias (cetilpiridinio) y resinas fósiles, precipitación con etanol y obtención de dos fracciones de PM (50-100 kDa y 500-730 kDa), libres de la fracción inflamatoria; las ultrafiltraciones en este contexto se utilizan para eliminar todas las moléculas inflamatorias con PM < 30.000 y para separar las dos fracciones deseadas de AH;
 EP535200: purificación de AH de crestas de gallo mediante salificaciones con aminas cuaternarias y posteriores precipitaciones con solventes (etanol o acetona). El AH se obtiene con PM variables de 750 a 65 1.230 kDa, libre de fracciones inflamatorias y destinado específicamente para uso oftálmico;

US6489467: purificación de AH a partir de *Streptococcus* mediante acidificación reforzada con HCl, posteriores variaciones de pH y diafiltraciones, obteniendo AH con PM de aproximadamente 1.700 kDa;

Choi et al, Biomaterials Research, 2014, 18, 1-10: purificación de AH de *Streptococcus zooepidemicus* mediante ultrafiltración y precipitación con acetona. El AH se obtiene con PM que varían entre 900 y 1.100 kDa;

EP2870255: purificación de AH de *Streptococcus zooepidemicus* mediante filtraciones (para eliminar impurezas), ultrafiltraciones (para concentrar el producto dentro de la solución en la que está presente), variaciones de pH y, por último, precipitación con etanol, obteniendo un PM que varía de 60 a 2.400 kDa;

EP1543103: purificación de AH de cultivos de *Streptococcus* mediante la adición de resinas aromáticas al caldo de cultivo previamente filtrado, que adsorben la mayoría de las impurezas, seguido de ultrafiltración para concentrar la solución de AH y, por último, precipitación con etanol.

WO2018/020458: purificación de AH a partir de cultivos de microorganismos del género *Streptococcus* o *Bacillus*, separados en fracciones que tienen un peso molecular preciso (92-230 kDa; 450-780 kDa; 920-1450 kDa) mediante tratamiento térmico. La purificación incluye, entre otras fases, etapas en resinas aromáticas seguidas de filtraciones repetidas y, por último, precipitación con solvente orgánico y lavados relativos.

Aunque los procesos aquí citados y los procesos normalmente utilizados en general, son capaces de producir un ácido hialurónico de alta calidad y con rendimientos aceptables, son extremadamente complejos y por lo tanto costosos en cuanto al uso de reactivos, solventes, filtros, etc. en términos de tiempo y, finalmente, en términos de costos a sostener para eliminar los residuos del procesamiento.

La presente invención supera los inconvenientes de la técnica conocida con un proceso de purificación extremadamente simplificado de la sal sódica del ácido hialurónico, que permite obtener un producto de altísima pureza, junto con un sorprendente ahorro de materiales y tiempo y un marcado incremento de los rendimientos industriales conocidos hasta ahora, alcanzando valores muy cercanos al 100%.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención se refiere a un nuevo proceso para la extracción de ácido hialurónico y su posterior purificación en forma de sal de metal alcalino y/o alcalinotérreo, preferentemente en forma de sal sódica, caracterizado por:

- un rendimiento muy alto;
- conveniencia industrial, gracias a la eliminación de numerosas etapas intermedias;
- un altísimo grado de pureza del producto final, completamente libre de contaminantes de cualquier tipo.

El proceso de extracción de ácido hialurónico desarrollado por el Solicitante es extremadamente sencillo, ya que proporciona un número estrictamente limitado de etapas operativas para alcanzar el producto final; esto significa un ahorro no solo en términos de materiales utilizados (solventes, reactivos, sales, resinas fósiles, resinas sintéticas, filtros, etc.), sino también en relación con la eliminación de los residuos del procesamiento: es bien conocido que los materiales utilizados en la industria química deben ser desechados de acuerdo con procedimientos seguros, considérese el caso, por ejemplo, de los solventes orgánicos. Finalmente, un menor número de etapas también corresponde, en este caso, a una reducción de los tiempos de procesamiento; la combinación de estos factores conduce a una mejor conveniencia industrial. Este proceso se puede aplicar a la purificación de AH preparado de acuerdo con cualquiera de las numerosas técnicas conocidas por los expertos en la técnica: el AH puede de hecho derivar de una fuente biológica, en particular de crestas de aves del género *Gallus* (EP0138572), a partir de la fermentación de *Streptococcus*, a partir de ingeniería molecular de *Bacillus Subtilis* y *Bacillus Megaterium* (EP2614088, EP2614087); este proceso es preferentemente aplicable a un AH obtenido de la fermentación de *Streptococcus*, en particular *Streptococcus equi* sub-esp. *equi*, 68222, mutante H-1 (EP0716688).

El proceso reivindicado en la presente memoria, como el Solicitante demuestra más adelante, permite la preparación de un AH de pureza extremadamente alta, no solo de conformidad con todas las especificaciones químicas/físicas requeridas por la Farmacopea Europea (Ph. Eur. 5.0 1472), sino incluso mayor, en particular en términos del contenido de endotoxinas bacterianas, proteínas, pirógenos.

Cabe recordar de hecho que, independientemente de la fuente de producción, si el producto final no ha sido perfectamente purificado, puede contener diversos tipos de contaminantes, como pirógenos, proteínas (derivadas del material biológico de partida), ácidos nucleicos, toxinas de origen bacteriano derivadas de bacterias Gram-positivas (*Streptococcus* o *Bacillus*, o de *Enterococci* y *Staphylococci*), o de bacterias Gram-negativas como, por ejemplo, *Escherichia Coli* o *Pasteurella* y *Salmonella*: la presencia de estas toxinas, por ejemplo, ácido lipoteicoico (ALT) o lipopolisacárido (LPS), en el producto final de ácido hialurónico, haría imposible su uso debido al alto riesgo de producir factores altamente proinflamatorios, a su vez causantes de inflamaciones y/o infecciones de la articulaciones o tejidos tratados, y en los casos más graves, provocando su

completa destrucción o necrosis.

Por último, el rendimiento del proceso de purificación de acuerdo con la presente invención es extremadamente alto, estableciéndose en valores que varían entre el 85 y el 100%.

5 El ácido hialurónico obtenido de acuerdo con la presente invención se puede utilizar con total seguridad, especialmente en todas las composiciones farmacéuticas inyectables (intraarticular, intradérmica e intraocular), ya que está libre de cualquier componente proinflamatorio y pirogénico. El AH purificado con el nuevo proceso, objeto de la invención, obtenido preferentemente en forma de sal de metal alcalino o alcalinotérreo, y aún más
10 preferentemente en forma de sal sódica, también se puede utilizar en la preparación de todos los derivados conocidos por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, sales de AH con metales pesados (EP0827514), ésteres (EP0216453), amidas (EP1095064), productos sulfatados (EP0940410) y productos reticulados, incluyendo los productos autorreticulados (EP0341745) de AH.

15 También se divulgan composiciones farmacéuticas, cosméticas y nutricionales que contienen AH obtenido con el proceso de purificación de acuerdo con la presente invención y específicamente:

- composiciones farmacéuticas para uso intraarticular para uso en la viscosuplementación de articulaciones artríticas, en daño articular traumático, en daño subcondral;
- 20 - composiciones farmacéuticas para uso intraocular o para administración ocular para el tratamiento de enfermedades oculares;
- composiciones farmacéuticas para su uso en la prevención de adherencias posquirúrgicas;
- composiciones farmacéuticas de uso tópico e inyectable (intradérmico y/o intramuscular) en el tratamiento de úlceras cutáneas, escaras, quemaduras de cualquier grado, cicatrices y lesiones cutáneas, en el
25 tratamiento de queloides o cicatrices hipo/hipertroóficas, en el tratamiento de todo tipo de defectos de la piel con piel intacta o dañada, y como terapia de tratamiento para enfermedades de la piel tales como eccema y diversos tipos de dermatitis, en particular dermatitis atópica y del pañal, psoriasis;
- composiciones farmacéuticas para uso intravesical, en particular para el tratamiento de la cistitis intersticial;
- composiciones farmacéuticas para uso inyectable como materiales de relleno en dermoestética o como
30 modelado corporal en cirugía estética;
- composiciones cosméticas para uso tópico y oral;
- composiciones farmacéuticas o nutricionales para el tratamiento oral de articulaciones artríticas, para el trofismo tendinoso, para el trofismo cutáneo y el trofismo de las membranas mucosas gastrointestinales.

35 También se divulgan biomateriales bidimensionales/tridimensionales que comprenden los derivados preparados con AH purificado de acuerdo con la invención, en forma de almohadillas, telas tejidas, telas no tejidas, granulados, películas y geles, también posiblemente combinados con células de diversos orígenes y/o derivados de la sangre como, por ejemplo, derivados de plaquetas.

40 Como ya ha sido indicado, el proceso de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a la purificación de AH obtenido de conformidad con las diversas técnicas conocidas ya que, en general, todos los procesos prevén algunas etapas comunes, que se pueden resumir de la siguiente manera:

producción:

45 dependiendo de la fuente seleccionada, se efectúa la digestión del material biológico, o la fermentación de microorganismos debidamente identificados o nuevamente, con base en las nuevas fronteras, con procedimientos biotecnológicos. Lo que se obtiene es básicamente un caldo fuertemente contaminado por materiales biológicos sólidos (la llamada biomasa), que contiene, en solución, ácido hialurónico y muchas
50 otras sustancias de diversos tipos, completamente indeseables. Cada procedimiento prevé también etapas para la eliminación de los residuos de producción (tanto sólidos como, en la medida de lo posible, disueltos), generalmente mediante la separación de la biomasa mediante varios procedimientos, de manera que se llegue a caldos filtrados que contengan AH, para ser sometidos a la etapa de extracción posterior: es en esta etapa que el AH se aísla y recupera del caldo de fermentación. Esta es la etapa en la que los
55 diversos procesos conocidos difieren aún más, tanto en términos de procedimientos operativos (reactivos, solventes, filtros, tensioactivos, etc.) como en el número de etapas y, por lo tanto, en términos de tiempo. Sin duda, es la parte más compleja y delicada del proceso, ya que es específicamente en la etapa de extracción donde se sientan las bases para el grado de pureza del producto final y el rendimiento del proceso industrial. El resultado de la etapa de extracción es, en general, una solución concentrada de AH que se somete a la llamada etapa de purificación:
60 aunque los procedimientos de purificación también están calibrados de acuerdo con la fuente de origen del ácido hialurónico, en general siguen líneas comunes, como es conocido por los expertos en la técnica:

se trata la fase líquida que contiene ácido hialurónico en solución para eliminar elementos no
deseados eventualmente presentes (proteínas, toxinas, etc.);
65 luego se efectúa la precipitación con solventes orgánicos (tales como etanol, acetona o mezclas de los

mismos) en los que AH es insoluble;

a esto le siguen repetidas disoluciones del precipitado en un vehículo acuoso y posteriores precipitaciones, solubilizaciones, filtraciones y lavados, hasta obtener el producto final, que luego es secado.

5 El proceso de purificación en un sentido amplio (entendido como una combinación de etapas partiendo del caldo de fermentación que conduce al producto final) de acuerdo con la presente invención, se centra en la etapa de extracción, que, independientemente de la fuente de AH, en los distintos procesos conocidos hasta la fecha, se articula en numerosos pasajes.

10 Es durante esta etapa, de hecho, que la mayor cantidad posible de producto deseado (AH) se debe aislar del caldo, al mismo tiempo que se elimina la mayor cantidad posible de todo tipo de impurezas, y esto explica el alto número de etapas operativas requeridas.

15 Es precisamente en esta etapa, por lo tanto, donde se definen los parámetros fundamentales sobre los que se va a evaluar un proceso de purificación, es decir:

rendimiento, es decir, la cantidad de producto obtenido;

pureza del producto obtenido;

20 conveniencia industrial, es decir, desperdicio de materiales y tiempo para obtener el producto deseado, con las características deseadas.

25 Sorprendentemente, el Solicitante ha descubierto que, partiendo de un caldo procedente de la etapa de producción (cualquiera que sea ésta), a través de una serie reducida de etapas, el proceso de extracción de acuerdo con la presente invención permite que prácticamente todo el ácido hialurónico presente en el caldo sea extraído del mismo y dicho AH, después de las etapas de purificación apropiadas de acuerdo con la técnica conocida, demuestra ser extremadamente puro en términos de pirógenos, proteínas, endotoxinas bacterianas.

30 Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a un proceso para la extracción y purificación de AH a partir de caldo de fermentación, preferentemente a partir de caldo de fermentación de microorganismos del género *Streptococcus* o *Bacillus*, en particular *S. equi*, *B. subtilis* o *B. megaterium*, más preferentemente *S. equi*, estando dicho proceso caracterizado porque comprende una etapa de extracción que comprende o consiste en las siguientes etapas:

35 a. dilución del caldo de fermentación filtrado con agua purificada, de 1,1 a 3 volúmenes, preferentemente igual a 1,5 con respecto al volumen inicial;

40 b. recirculación forzada del caldo procedente de la etapa a. formado por la unión de permeado y retenido dentro de casetes de Filtro de Flujo Tangencial (FFT) que contienen membranas de ultrafiltración hechas de material polimérico arilsulfónico, preferentemente polietersulfona, con una porosidad que varía de 5.000 a 300.000 Daltons, preferentemente de 50.000 a 200.000 e incluso más preferentemente igual a 100.000 Daltons, en el que la recirculación forzada se repite durante un tiempo que varía de 1 a 6 horas, preferentemente igual a 3 horas, siendo realizada dicha recirculación con flujo unidireccional y en un sistema cerrado, a volumen constante sin introducir líquidos del exterior.

45 Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un proceso de extracción de AH a partir de caldo de fermentación, preferentemente de caldo de fermentación de microorganismos del género *Streptococcus* o *Bacillus*, en particular *S. equi*, *B. subtilis* o *B. megaterium*, más preferentemente *S. equi*, dicho proceso comprende o consiste en las siguientes etapas:

50 a. dilución del caldo de fermentación filtrado con agua purificada, de 1,1 a 3 volúmenes, preferentemente igual a 1,5 con respecto al volumen inicial;

55 b. recirculación forzada del caldo procedente de la etapa a. formado por la unión de permeado y retenido dentro de casetes de Filtro de Flujo Tangencial (FFT) que contienen membranas de ultrafiltración hechas de material polimérico arilsulfónico, preferentemente polietersulfona, con una porosidad que varía de 5.000 a 300.000 Daltons, preferentemente de 50.000 a 200.000 e incluso más preferentemente igual a 100.000 Daltons, en el que la recirculación forzada se repite durante un tiempo que varía de 1 a 6 horas, preferentemente igual a 3 horas, siendo realizada dicha recirculación con flujo unidireccional y en un sistema cerrado, a volumen constante sin introducir líquidos del exterior.

60 El proceso de extracción desarrollado por el Solicitante permite la extracción casi total y, por lo tanto, la recuperación, del ácido hialurónico presente en el caldo filtrado inicial alcanzando rendimientos que varían entre el 95 y el 100%.

65 Por lo tanto, estos altos rendimientos de extracción dan como resultado rendimientos de producto terminado mucho más altos que los conocidos hasta ahora, ya que, durante las posteriores etapas de precipitación y lavado

típicas de estos procesos, las únicas pérdidas de AH en términos cuantitativos son las relacionadas con las operaciones (por ejemplo, cantidades mínimas de AH permanecen adheridas al equipo utilizado); por lo tanto, se supone que el rendimiento de la etapa de extracción predice fuertemente el rendimiento de todo el proceso de purificación.

5

El proceso de extracción y purificación de AH de acuerdo con la presente invención puede proporcionar que la etapa b. de recirculación forzada puede ir seguida de las siguientes etapas:

- 10 c. diafiltración I del retenido contenido en los casetes de FFT de la etapa b. con una solución de diafiltración seleccionada entre agua purificada y una solución salina, preferentemente agua purificada;
 d. concentración del volumen derivado de la etapa c. hasta un volumen igual al del caldo de partida;
 e. diafiltración II del volumen derivado de la etapa d. con una solución de diafiltración seleccionada entre agua purificada y una solución salina, preferentemente agua purificada, repitiendo dicha diafiltración de 5 a 15 veces, preferentemente de 6 a 12 veces;
 15 f. concentración final del volumen derivado de la etapa e. hasta obtener un volumen final igual a un tercio del volumen del caldo de partida;
 g. recuperación del producto retenido dentro de los casetes de FFT mediante la circulación de agua purificada hasta obtener un volumen total igual a la mitad del caldo de partida.

20 El proceso de extracción de acuerdo con la presente invención tiene su punto fuerte en el uso innovador de la técnica de ultrafiltración (UF). En general, la técnica de UF es un proceso conocido que permite aislar un componente de una fase líquida en la que se encuentra dicho componente, y que tiene un peso molecular superior al definido por los poros de la membrana filtrante (corte). Muy esquemáticamente, la fase líquida (alimentación), contenida en un tanque específico, es empujada por una bomba contra una membrana filtrante
 25 provista de poros de dimensiones precisas (corte). El fluido que pasa a través de la membrana del filtro se recoge aguas abajo y forma el filtrado o permeado, y se desecha; el componente a recuperar se retiene sobre la superficie de la membrana y forma el retenido que contiene el producto de interés. Con el fin de recuperar la mayor cantidad posible de producto, el retenido se somete a múltiples ciclos de UF, reintroduciéndolo en el tanque y redirigiéndolo como alimentación a los casetes de UF, con eliminación del permeado obtenido en cada ocasión. La eliminación progresiva del permeado conduce obviamente a una concentración debida a la pérdida
 30 de volumen, que luego se compensa con la adición de un líquido adecuado en el tanque. La eliminación progresiva del permeado conduce evidentemente a una pérdida de ácido hialurónico, que los filtros de UF no pueden retener por completo.

35 Con el fin de obtener un producto final lo más puro posible, el ciclo es seguido, como conocen los expertos en la técnica, por una o más etapas de diafiltración, introduciendo un líquido adecuado (solución de diafiltración) desde el exterior, con el fin de crear un flujo de lavado que, al fluir a través del retenido, ayuda a eliminar las impurezas aún presentes. Cuando, como en el caso de la presente invención, se deben separar las moléculas de origen biológico, teniendo generalmente dimensiones significativas en términos de Peso Molecular, la UF que se adopta
 40 es la denominada Filtración de Flujo Tangencial (FFT).

Por lo tanto, el Solicitante ha desarrollado un proceso innovador para la extracción de AH a partir de un caldo de fermentación, preferentemente de un caldo de fermentación de microorganismos del género *Streptococcus* o *Bacillus*, en particular *S. equi*, *B. subtilis* o *B. megaterium*, más preferentemente *S. equi*, un proceso que,
 45 mediante el uso innovador de la técnica de FFT, permite una recuperación casi total del ácido hialurónico del caldo que lo contiene.

De hecho, el Solicitante ha descubierto sorprendentemente que precediendo la FFT por una etapa de dilución y posterior recirculación forzada del caldo de cultivo que se está procesando, se obtiene una recuperación
 50 prácticamente total del ácido hialurónico presente en el mismo caldo. Esta recirculación forzada se lleva a cabo, como se explica a detalle a continuación, enviando el caldo de cultivo a los casetes de FFT correspondientes, recogiendo el permeado obtenido (y NO eliminándolo, como lo requiere el estado de la técnica) y, después de transportarlo al interior del tanque del que deriva el caldo original, redirigiéndolo nuevamente a los mismos casetes de FFT, dentro de los cuales se comportará como una alimentación: de esta manera, el AH aún presente
 55 en la alimentación recirculante constituirá un retenido adicional, y el permeado producido gradualmente repetirá el ciclo descrito anteriormente (recirculación forzada). En esta etapa, el retenido y el permeado se unen por lo tanto en el tanque que contenía la alimentación inicial y se recirculan con un flujo unidireccional. Todo esto se lleva a cabo sin introducir líquidos desde el exterior, manteniendo constante el volumen en el interior del sistema, consecuentemente en un sistema cerrado. Todo el sistema está naturalmente equipado con una serie de
 60 válvulas que regulan los caudales y salidas, bombas de presión variable para el transporte de los líquidos, manómetros para el control de los valores de presión.

Como ya se mencionó anteriormente, el conjunto de operaciones descritas determina una recuperación casi total de AH del caldo de partida, con rendimientos que varían del 95 al 100%.

65

Por lo tanto, es evidente que la invención en cuestión modifica sustancialmente el estado de la técnica, mejorando significativamente el rendimiento del proceso (más ácido hialurónico recuperado) y, en cascada, la conveniencia industrial (menos etapas significa menores cantidades de materiales, filtros, etc. ... usados y pequeñas cantidades de residuos a eliminar).

5 Más específicamente, el flujo operativo por el que se lleva a cabo el proceso descrito por la presente invención parte, como ya se ha indicado, de un caldo que contiene AH y procede de cualquier etapa de producción inicial, preferentemente de la fermentación de *Streptococcus*, en particular de la fermentación de *Streptococcus equi*
 10 sub-esp. *equi*, 68222, mutante H-1 (EP0716688). En este caso específico, el caldo se ajusta a un pH comprendido entre 4,0 y 5,0, preferentemente 4,5 con una solución ácida para ácido fuerte, preferentemente HCl y posteriormente se separa de la biomasa mediante una de las técnicas de separación conocidas por las personas calificadas en el campo (centrifugación y/o microfiltración y/o filtración sobre almohadillas de harina fósil).

15 El volumen de caldo filtrado obviamente varía dependiendo de la capacidad de la planta industrial; en este caso específico, el volumen puede variar de 2.000 litros a 4.000 litros; el procedimiento se aplica preferentemente a un tamaño de lote de 3.000 litros. A esto le sigue la etapa de extracción:
 el caldo así obtenido se somete a las siguientes etapas de manera sucesiva:

20 a. dilución: el caldo procedente de la etapa de producción y tratado como se describió anteriormente, se introduce en un tanque adecuado y se diluye con agua purificada hasta un volumen total que varía de 1,1 a 3 volúmenes, preferentemente igual a 1,5 volúmenes en comparación con el volumen inicial. Este es un enfoque completamente innovador ya que, de acuerdo con el estado de la técnica, el caldo de partida está concentrado, por lo que se deben procesar volúmenes menores;

25 b. recirculación forzada: el caldo así diluido (alimentación) se hace circular, mediante un sistema que comprende una bomba, dentro de los casetes de FFT que contienen membranas de UF hechas de material polimérico arilsulfónico, preferentemente polietersulfona, con una porosidad variable (corte) que varía de 5.000 a 300.000 Daltons, preferentemente de 50.000 a 200.000 e incluso más preferentemente igual a 100.000 Daltons, sin introducir la solución de ultrafiltración y sin descargar el permeado, por lo tanto, dentro
 30 de un sistema cerrado. De este modo se crea una recirculación forzada del caldo, en la que el permeado, en lugar de ser eliminado como suele ser el caso, se reintroduce en el tanque y se une con el retenido que se produce gradualmente y se envía a la membrana del filtro. El permeado, de hecho, al menos durante los primeros ciclos, contiene no solo sales minerales y varios tipos de impurezas, sino también AH en solución. La recirculación forzada del caldo también crea una capa gelatinosa de AH dentro del casete de UF, que actúa como un filtro adicional para el AH aún presente en el permeado y, al mismo tiempo, evita la obstrucción del sistema. Cabe señalar que la recirculación forzada y todo el sistema de extracción se caracterizan por un flujo unidireccional de la fase líquida (alimentación y otros líquidos). La recirculación forzada se mantiene durante un tiempo que varía de 1 a 6 horas, preferentemente igual a 3 horas, y se somete a prueba a intervalos regulares de 30 minutos hasta obtener una muestra de permeado, llevada con
 35 NaCl en forma de polvo a una molaridad final de 0,3 M en NaCl y con la adición de dos volúmenes de etanol, no proporciona ningún precipitado (como ya se mencionó, la precipitación con etanol es una de las técnicas más simples e inmediatas para aislar AH de una fase líquida). Esto significa que sustancialmente todo el AH presente en el caldo inicial ha sido retenido en el casete de FFT dentro del retenido: es evidente que la innovación prácticamente elimina las pérdidas de producto, lo que resulta en una enorme ventaja
 40 industrial.

El rendimiento de la etapa de extracción se calculó con el procedimiento del carbazol (Ph. Eur. 5.0; 1472, 01/2011); a modo de resumen, la concentración del AH presente en el caldo al final de la fermentación y la concentración de AH obtenida al final de la etapa de extracción se determinan con el procedimiento del carbazol.
 50 Más específicamente, se calcula la proporción entre la cantidad en gramos de AH extraída según lo descrito contra los litros iniciales de caldo al final de la fermentación; una proporción simple permite calcular el valor de rendimiento expresado como porcentaje de AH extraído contra el AH inicial en el caldo.

El rendimiento de la etapa de extracción desarrollada dentro de la presente invención calculado de este modo varía de 95 a 100%. A esto le sigue lo que conocen los expertos en la técnica; en particular, el Solicitante
 55 procede con las etapas de diafiltración y preferentemente de la siguiente manera:

60 c. diafiltración I: el permeado derivado de la etapa b. anterior, completamente vaciado de su contenido de AH, se elimina a través de la abertura de la válvula de descarga. El suministro de solución de diafiltración se abre y se mantiene continuo para crear un flujo constante de solución de diafiltración a través del retenido, así como el volumen que circula dentro del tanque se mantiene constante, mediante la eliminación del permeado que se forma gradualmente. La solución de diafiltración a utilizar puede ser agua purificada o solución salina, preferentemente agua purificada. Este procedimiento se mantiene durante el tiempo necesario para eliminar un volumen de permeado igual al doble del presente en el tanque al final de la
 65 etapa de recirculación forzada.

d. concentración: manteniendo la descarga abierta y bloqueando el suministro de la solución de diafiltración, el contenido del tanque se concentra hasta que vuelve a los volúmenes del caldo de partida antes de la dilución inicial (por lo tanto, antes de la etapa a.).

5 e. diafiltración II: se repite la etapa de diafiltración sobre el volumen derivado de la etapa d., como se describe en la etapa c. de 5 a 15 veces, preferentemente de 6 a 12 veces.

Por último, la recuperación de AH se efectúa, según la técnica conocida, y preferentemente mediante concentración final:

10 se adopta el mismo procedimiento descrito en el punto d., hasta obtener un volumen final igual a aproximadamente un tercio del volumen inicial (antes de la etapa a.),
y posterior recuperación:

15 el producto retenido dentro de los casetes se recupera mediante la circulación de agua purificada hasta obtener un volumen igual a la mitad del volumen del caldo antes de la dilución inicial (por lo tanto, antes de la etapa a.).

20 En este punto, el AH presente en la solución obtenida del proceso descrito anteriormente pasa a la etapa de purificación específica, que es convenientemente seleccionada por la persona calificada en el campo, ya que es una técnica conocida, y a la etapa de secado posterior.

25 En resumen, el objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento altamente eficiente para la extracción de AH en términos de rendimiento, pureza del producto y conveniencia industrial, cuando se aplica dentro de un proceso global de extracción y purificación de AH producido por fermentación a partir de microorganismos del género *Streptococcus* o *Bacillus*, en particular *S. equi*.

30 Su característica totalmente innovadora radica en que la FFT es precedida por una etapa de dilución y recirculación forzada del caldo de cultivo en proceso; este procedimiento puede ser aplicado con éxito dentro de cualquier proceso global conocido para la producción y purificación de AH, independientemente de la fuente de AH, la forma en que sea tratada esta fuente y la forma en que llega al producto final en forma seca, listo para el uso al que está destinado.

35 Más específicamente, el Solicitante reivindica un procedimiento para la extracción de AH con un alto rendimiento a partir de un caldo obtenido de conformidad con las técnicas conocidas, en particular obtenido por fermentación de *Streptococcus*, más preferentemente por fermentación de *Streptococcus equi* sub-esp. *equi*, 68222, mutante H-1 (EP0716688), que comprende o consiste en las siguientes etapas:

Extracción:

40 a. dilución: el caldo de producción filtrado se diluye con agua purificada hasta un volumen que varía de 1,1 a 3 volúmenes, preferentemente igual a 1,5 con respecto al volumen inicial;

45 b. recirculación forzada: el caldo procedente de la etapa a. formado por la unión de retenido y permeado, se somete a recirculación forzada dentro de casetes de Filtro de Flujo Tangencial (FFT) que contienen membranas de ultrafiltración hechas de material polimérico arilsulfónico, preferentemente polietersulfona, con una porosidad que varía de 5.000 a 300.000 Daltons, preferentemente de 50.000 a 200.000 e incluso más preferentemente igual a 100.000 Daltons. La recirculación forzada se repite durante un tiempo que varía de 1 a 6 horas, preferentemente igual a 3 horas, hasta la completa retención de AH dentro del retenido, siendo realizada dicha recirculación con flujo unidireccional y en un sistema cerrado, a volumen constante sin la introducción de líquidos del exterior.

50 A continuación, se adopta el procedimiento de acuerdo con lo que conocen los expertos en la técnica, en particular con las etapas de diafiltración y preferentemente de la siguiente manera:

55 c. diafiltración I: se realiza con una solución de diafiltración seleccionada entre agua purificada y solución salina, preferentemente agua purificada, y se mantiene el tiempo necesario para eliminar un volumen de permeado igual al doble del presente en el tanque después de la etapa b. anterior;

d. concentración: el contenido del tanque se concentra hasta el volumen del caldo de partida (antes de la etapa a.);

60 e. diafiltración II: una diafiltración según lo descrito en la etapa c. se repite de 5 a 15 veces, preferentemente de 6 a 12 veces, en el volumen derivado de la etapa d.;

f. concentración final: el volumen que se deriva de la etapa e. se concentra hasta obtener un volumen igual a un tercio del volumen inicial (antes de la etapa a.);

g. recuperación: el producto retenido dentro de los casetes se recupera mediante la circulación de agua purificada hasta obtener un volumen total igual a la mitad del caldo antes de la etapa a.

65 Una vez que se han completado todas las etapas descritas en la presente memoria, las denominadas etapas de

- purificación se llevan a cabo utilizando las técnicas conocidas por los expertos en la técnica; solo a modo de ejemplo, se puede mencionar el tratamiento con bases fuertes alcalinas o alcalinotérreas, preferentemente alcalinas y en particular NaOH, para eliminar posibles contaminantes adicionales, seguido de filtraciones (por ejemplo, sobre carbón y/o telas de filtración y/o sobre polipropileno), precipitaciones en solventes orgánicos, como por ejemplo etanol, con diluciones variables y, por último, lavados en solventes orgánicos (preferentemente etanol); entre los diversos procesos de purificación, se prefiere particularmente el descrito en el Ejemplo 3 del documento de patente WO2018/020458, una parte integral de la presente descripción.
- Independientemente del proceso de purificación seleccionado, se obtiene AH salificado, preferentemente en forma de sal sódica.
- El AH salificado así purificado se somete luego a un secado que permite su óptima conservación antes de ser adoptado para los usos a los que está destinado.
- El producto así obtenido demuestra no solo cumplir con los parámetros de la Farmacopea Europea (Ph. Eur. 5.0; 1472), sino que es aún mayor en términos de contenido de endotoxinas bacterianas y proteínas.
- El rendimiento final del proceso, calculado mediante el procedimiento del carbazol (Ph. Eur. 5.0; 1472) descrito anteriormente, confirma que la pérdida de producto es mínima en esta fase y debido a los límites operativos; de hecho, el rendimiento se asienta dentro de un intervalo del 85 al 100%, preferentemente en el intervalo del 95 al 100%.
- Ejemplo 1: Extracción de AH de caldo de fermentación de *Streptococcus equi*, 3.000 litros de caldo de fermentación de *Streptococcus equi* sub-esp. *equi*, 68222, mutante H-1 se llevan a un pH = 4,5 mediante la adición de una solución de HCl 1 N con agitación y posteriormente se les priva de la biomasa mediante filtración con almohadillas de Celite (harina fósil de diatomeas).
- El caldo así tratado se diluye luego con 1.500 litros de agua purificada, hasta un volumen final de 4.500 litros, y se coloca en un reactor de capacidad adecuada (6.000 litros). El volumen de caldo obtenido se somete a la etapa de recirculación forzada, utilizando casetes de FFT (Pall, modelo Omega), provistos de membranas de polietersulfona con una porosidad (corte) igual a 100.000 Daltons. La alimentación se introduce en los casetes con una presión de entrada no superior a 2,5 bares (250 kPa), ejercida por la bomba. La recirculación forzada se mantiene durante 3 horas y, a intervalos de 30 minutos, se efectúa un ensayo para evaluar la presencia de AH en el permeado: se añaden 32 ml de NaCl y dos volúmenes de etanol a 2 ml de permeado. Al final de las 3 horas de recirculación forzada, la prueba da un resultado negativo, es decir, no se forma precipitado, lo que significa que el AH ha sido retenido por completo en el retenido.
- Se bloquea la recirculación forzada y se calcula el rendimiento con el procedimiento del carbazol descrito anteriormente, que es igual al 98%. A continuación, se inicia la primera etapa de diafiltración a volumen constante, mediante la introducción de agua depurada en el tanque de recolección, durante el tiempo necesario para pasar, a través de los casetes de UF, una cantidad de agua igual a 9.000 litros, por lo tanto, igual al doble del volumen presente en el tanque. En esta etapa se abre la válvula de descarga y se eliminan 9.000 litros de permeado, dirigidos hacia un contenedor de eliminación específico.
- El volumen de retenido se concentra ahora hasta el volumen inicial (3.000 litros), mediante el cierre del suministro de agua purificada mientras que la descarga permanece abierta.
- Se repite la diafiltración con agua purificada hasta la eliminación de un total de 24.000 litros de permeado, completando así 8 ciclos de diafiltración.
- La concentración final de la solución se efectúa luego cerrando el suministro de agua purificada, hasta un volumen de 1.000 litros. A continuación, el producto se recupera con agua depurada: manteniendo cerrada la válvula de descarga, se añaden al depósito 500 litros de agua, en fracciones sucesivas. El agua circula por el interior del sistema, recuperando continuamente el retenido y reintroduciéndolo en la alimentación, con el fin de desprender todo el AH contenido en los casetes de FFT y el adherido a las paredes del sistema; de este modo, se obtiene un volumen final de 1.500 litros, óptimo para las siguientes etapas de purificación, realizándose dicha purificación según lo descrito en el Ejemplo 3 del documento de patente WO2018/020458 hasta que el producto final, ácido hialurónico en forma de sal sódica, se obtiene en forma de polvo seco.
- Más específicamente, se añade NaOH 0,2 M en agua al producto recuperado y luego se neutraliza toda la mezcla con HCl 12 N hasta que el pH se lleva a 8,5 y finalmente se filtra a través de un filtro de polipropileno. La solución de AH, ahora en forma de sal sódica, se precipita con etanol absoluto y se mantiene en agitación durante 30 minutos. Se deja reposar el producto durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante por sifón. El producto se lava con una mezcla de etanol:agua (80:20) con agitación continua durante 30 minutos y luego se elimina el sobrenadante por sifón. El último lavado se realiza con etanol absoluto que finalmente se elimina por

filtración. El producto obtenido se coloca en bandejas especiales de acero inoxidable y se seca durante al menos 22 horas a una temperatura de 25 °C al vacío.

Análisis del producto final:

- 5 contenido de proteínas: < 0,1%, de conformidad con la Ph. Eur. 5.0, 1472
 contenido de endotoxinas bacterianas: < 0,05%, de conformidad con la Ph. Eur. 5.0, 1472
 rendimiento: 96,2%
- 10 Los datos aquí presentados muestran claramente que la inserción del proceso de extracción, objeto de la presente invención, dentro de un proceso para la producción, extracción y purificación de ácido hialurónico por fermentación de microorganismos conocidos en el estado de la técnica, aumenta sorprendentemente el rendimiento del proceso en su totalidad, permitiendo una mejora en su eficiencia mucho mayor que la conocida hasta ahora en el estado de la técnica. A este respecto, conviene recordar que, en general, el rendimiento de los procesos conocidos considerados especialmente eficientes se establece entre el 60 y el 80%.
- 15
- La inserción de la etapa de extracción o proceso desarrollado por el Solicitante también hace que el proceso global sea industrialmente más conveniente; de hecho, se eliminan las etapas para la adición de sales complejantes o resinas adsorbentes, filtraciones en paños o filtros, fases repetidas de solubilización y precipitación con solventes orgánicos, lo que lleva a un ahorro neto tanto en términos de tiempos de procesamiento como en el uso de materiales y, finalmente, también en términos de los residuos a eliminar.
- 20

25

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la extracción y purificación de ácido hialurónico (AH) a partir de caldo de fermentación, preferentemente a partir de caldo de fermentación de microorganismos del género *Streptococcus* o *Bacillus*, en particular *S. equi*, *B. subtilis* o *B. megaterium*, más preferentemente *S. equi*, **caracterizado porque** comprende una etapa de extracción que comprende o consiste en las siguientes etapas:
- a. dilución del caldo de fermentación filtrado con agua purificada, de 1,1 a 3 volúmenes, preferentemente igual a 1,5 con respecto al volumen inicial;
- b. recirculación forzada del caldo procedente de la etapa a. formado por la unión de retenido y permeado, dentro de casetes de Filtro de Flujo Tangencial (FFT) que contienen membranas de ultrafiltración hechas de material polimérico arilsulfónico, preferentemente polietersulfona, con una porosidad que varía de 5.000 a 300.000 Daltons, preferentemente de 50.000 a 200.000 e incluso más preferentemente igual a 100.000 Daltons, en el que la recirculación forzada se repite durante un tiempo que varía de 1 a 6 horas, preferentemente igual a 3 horas, siendo realizada dicha recirculación con flujo unidireccional y en un sistema cerrado, a volumen constante sin introducir líquidos del exterior.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de recirculación forzada b. va seguida de las siguientes etapas:
- c. diafiltración I del retenido contenido en los casetes de FFT de la etapa b. con una solución de diafiltración seleccionada entre agua purificada y una solución salina, preferentemente agua purificada;
- d. concentración del volumen derivado de la etapa c. hasta un volumen igual al del caldo de partida;
- e. diafiltración II del volumen derivado de la etapa d. con una solución de diafiltración seleccionada entre agua purificada y una solución salina, preferentemente agua purificada, repitiendo dicha diafiltración de 5 a 15 veces, preferentemente de 6 a 12 veces;
- f. concentración final del volumen derivado de la etapa e. hasta obtener un volumen final igual a un tercio del volumen del caldo de partida;
- g. recuperación del producto retenido dentro de los casetes de FFT mediante la circulación de agua purificada hasta obtener un volumen total igual a la mitad del caldo de partida.
3. El proceso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el rendimiento del proceso varía de 85 a 100%, preferentemente de 95 a 100%.
4. El proceso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el AH purificado tiene un contenido de proteína total < 0,1% y un contenido de endotoxinas bacterianas < 0,05%.
5. El proceso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el caldo de fermentación es un caldo de fermentación de *Streptococcus equi* sub-esp. *equi*, 68222, mutante H-1.
6. El proceso de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el AH purificado está en forma de una sal de metales alcalinos o alcalinotérreos, preferentemente alcalinos, e incluso más preferentemente en forma de sal sódica.
7. Un proceso de extracción de ácido hialurónico (AH) de caldo de fermentación, preferentemente de caldo de fermentación de microorganismos del género *Streptococcus* o *Bacillus*, en particular *S. equi*, *B. subtilis* o *B. megaterium*, más preferentemente *S. equi*, dicho proceso comprende o consiste en las siguientes etapas:
- a. dilución del caldo de fermentación filtrado con agua purificada, de 1,1 a 3 volúmenes, preferentemente igual a 1,5 con respecto al volumen inicial;
- b. recirculación forzada del caldo procedente de la etapa a. formado por la unión de retenido y permeado, dentro de casetes de Filtro de Flujo Tangencial (FFT) que contienen membranas de ultrafiltración hechas de material polimérico arilsulfónico, preferentemente polietersulfona, con una porosidad que varía de 5.000 a 300.000 Daltons, preferentemente de 50.000 a 200.000 e incluso más preferentemente igual a 100.000 Daltons, en el que la recirculación forzada se repite durante un tiempo que varía de 1 a 6 horas, preferentemente igual a 3 horas, siendo realizada dicha recirculación con flujo unidireccional y en un sistema cerrado, a volumen constante sin introducir líquidos del exterior.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el caldo de fermentación es un caldo de fermentación de *Streptococcus equi* sub-esp. *equi*, 68222, mutante H-1.