

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039639**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.02.21**

**(21)** Номер заявки  
**201992340**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.07.17**

**(51)** Int. Cl. **B01D 61/14** (2006.01)  
**A61K 31/728** (2006.01)  
**C08B 37/08** (2006.01)

**(54) СПОСОБ ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

**(31)** 102017000081449; 62/533,798

**(32)** 2017.07.18

**(33)** IT; US

**(43)** 2020.03.31

**(86)** PCT/IB2018/055291

**(87)** WO 2019/016699 2019.01.24

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ФИДИЯ ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.**  
**(IT)**

**(72)** Изобретатель:  
**Корса Винченца, Карпанзэ**  
**Джанкарло (IT)**

**(74)** Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

**(56)** WO-A1-2014005822

SUNGCHUL CHOI ET AL.: "Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials", BIOMATERIALS RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 18, no. 1, 13 June 2014 (2014-06-13), page 6, XP021195320, ISSN: 2055-7124, DOI: 10.1186/2055-7124-18-6 cited in the application page 2, column 2, last paragraph - page 3, column 1, paragraph 1

WO-A1-2011114475

ZHOU H. ET AL.: "Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration", SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, vol. 52, no. 1, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 29-38, XP028035496, ISSN: 1383-5866, DOI: 10.1016/J.SEPUR.2006.03.011 [retrieved on 2006-11-01] the whole document especially 3.4

WO-A1-2008062998

WO-A2-2008035372

**(57)** Изобретение относится к области, касающейся способов экстракции и очистки гиалуроновой кислоты из ферментационного бульона, которые предусматривают следующие стадии: а) разбавление отфильтрованного ферментационного бульона очищенной водой; б) принудительная рециркуляция бульона, поступающего из стадии а), образованного объединением ретентата и пермеата, внутри кассет фильтра тангенциального потока, содержащих ультрафильтрационные мембраны, где принудительную рециркуляцию повторяют в течение времени в диапазоне от 1 до 6 ч, причем указанную рециркуляцию проводят с помощью однонаправленного потока и в замкнутой системе при постоянном объеме без введения жидкостей извне. С помощью указанных стадий способы в общем становятся более удобными с точки зрения промышленного производства, наряду с общим сохранением относительно технологического времени, применения материалов и подлежащих утилизации отходов. Способы по настоящему изобретению неожиданно повышают технологический выход в целом, что обеспечивает намного большее улучшение их эффективности.

**B1****039639****039639****B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Гиалуроновая кислота (НА) представляет собой линейный, анионный, высокомолекулярный полисахарид без сульфатных групп, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Она присутствует в природе в перичеллюлярной жидкости, в основном веществе соединительной ткани позвоночных организмов (одним из основных компонентов которого она является), в синовиальной жидкости суставов, в стекловидном теле и в пуповине. В силу этого НА играет важную роль в биологическом организме, прежде всего как механическая опора для клеток многих тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящ.

Также известно, что НА через свои мембранные рецепторы, в частности CD44, CD54 и CD168, модулирует множество различных процессов, связанных с физиологией и биологией клетки, таких как, например, пролиферация, миграция, дифференцировка клеток и ангиогенез, и что она также выполняет другие функции, такие как увлажнение тканей и смазывание суставов. Она полностью биосовместима, и благодаря своим многочисленным особенностям в течение многих лет ее широко применяют в различных областях в диапазоне от восстановления тканей до вискоэлаплекментарной терапии, от эстетической в отношении кожи медицины до эндоокулярной хирургии, от тканевой инженерии до клеточной терапии и гораздо больше.

Химико-физические и биологические характеристики НА тесно связаны с ее молекулярной массой (MW - относится к средневесовой MW, рассчитанной способом "характеристической вязкости"), которая является чрезвычайно изменчивой: в целом можно сказать, что средневесовая MW НА варьирует приблизительно от 20000 до  $13 \times 10^6$  Да, и сопоставление является обязательным требованием, поскольку масса полностью изменяется в зависимости от источника и способа получения и очистки, применяемых для ее выделения.

Собственно, существует два основных способа получения НА.

Получение из источников животного происхождения: исторически НА экстрагируют из тканей животных, таких как пуповина, стекловидное тело или бычьей синовиальной жидкости и особенно куриных гребней. Получение из источников животного происхождения имеет многочисленные ограничения, например, оно является дорогостоящим, поскольку для удаления различных видов примесей требуются многочисленные стадии (начиная с большого количества органических остатков после расщепления исходной ткани), а также необходимы стадии для обеспечения инактивации и удаления любого загрязняющего вещества (такого как вирусы), возможно присутствующего в исходном материале, это требует наличия значительных количеств сырьевого материала и не дает больших выходов.

Ферментация микроорганизмов: некоторые микроорганизмы, в частности род *Streptococcus* или *Pasteurella*, при соответствующей стимуляции и/или модификации, способны продуцировать НА, которая секретируется в культуральный бульон, из которого ее выделяют различными способами, известными квалифицированным специалистам в данной области. Также в этом случае требуются многочисленные стадии для удаления присутствующих "примесей", таких как, например, остатки клеточных стенок используемых микроорганизмов, ионы металлов, нуклеиновые кислоты и любой другой нежелательный белковый материал. Несмотря на эти ограничения, это все еще наиболее развитый и широко применяемый способ получения НА.

Также изучаются новые способы получения НА с помощью биотехнологии, посредством трансфекции генов, экспрессирующих фермент НА-синтазу, в подходящих клетках-хозяевах, таких как некоторые роды *Bacillus* (*Megaterium* и *Subtilis*) и *Escherichia coli*. Все процедуры, необходимые для удаления любых потенциально вредных остатков, однако также необходимы для этих способов получения.

В любом случае, независимо от применяемого способа, ключевой стадией получения НА, безусловно, является фаза экстракции и очистки полисахарида. Существует множество известных способов, все из которых чрезвычайно четко сформулированы и, безусловно, модулированы в зависимости от исходных источников получения НА.

Прежде всего должны быть удалены остатки источника, вследствие этого, в отношении экстракции из ткани животного существуют фазы расщепления белков и последующие стадии фильтрации, центрифугирования и промывания; в отношении ферментации обычно проводят стадии центрифугирования и поэтапного промывания. В любом случае получают жидкую фракцию, из которой затем выделяют полисахарид. В этом отношении наиболее широко известным и, безусловно, наиболее часто применяемым способом, особенно в отношении НА, полученной из источников животного происхождения, является осаждение растворителем: для больших линий в вышеуказанной жидкой фракции применяют увеличивающиеся концентрации органических растворителей (этанол, ацетон), вызывая осаждение гиалуроновой кислоты, которую затем очищают путем последующих стадий солиubilизации и осаждения.

Альтернативная система предусматривает применение четвертичных солей, например цетилпиридиния или цетилтриметиламмония, с возможностью образования комплексов полисахарида и стимулирования его осаждения. Опять же последующие стадии солиubilизации и осаждения необходимы для получения конечного продукта.

Разработка методик также объединяет ключевые стадии, описанные выше, чтобы сделать способ продуктивным с точки зрения выхода и эффективным с точки зрения чистоты: однако до настоящего

времени все еще имеется много, порядка нескольких сотен, побочных явлений, о которых сообщается ежегодно компетентными органами (например, FDA), которые произошли, в частности, после введения фармацевтических композиций на основе НА.

Гиалуроновую кислоту применяют в широком круге областей и при широком спектре патологий: от косметических средств (для местного или перорального введения) с увлажняющим действием до местных лечебно-косметических средств для кожи с успокаивающим действием, от инъекционных устройств для коррекции дефектов кожи (внутрикожных), будь-то морщины или шрамы, до более строгих фармакологических применений, таких как внутрисуставное применение при костно-суставных патологиях, внутриглазное в качестве замены стекловидного тела, интравезикальное против интерстициального цистита и так далее.

Принимая во внимание, что для косметических применений, которые не касаются поврежденных тканей, достаточно НА с косметической степенью чистоты (менее чистой), очевидно, что в случае фармацевтических применений, особенно применений инъекционных средств, в том числе особенно инъекционных средств в закрытых полостях (сустав и глаз), требуется степень абсолютной чистоты: из-за природы материалов, из которых экстрагируют гиалуроновую кислоту, фактически, в конечном продукте могут присутствовать, в остаточной форме, нуклеиновые кислоты, белки и/или остаточные бактериальные токсины клеточной стенки грамположительных бактерий (например, рода *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Staphylococcus*), такие как липотейхоевая кислота (LTA), или грамотрицательных бактерий (таких как, например, *Escherichia coli*, *Pasteurella* и *Salmonella*), такие как липополисахарид (LPS). Эти различные виды загрязняющих веществ способны вызывать значительную воспалительную реакцию с последующим высвобождением, как на локальном, так и на системном уровне, цитокинов (в частности, TNF и IL-1), которые, в свою очередь, способны вызывать генерализованную воспалительную реакцию с последствиями для всего организма, в большинстве тяжелых случаев приводя к формам септического шока.

LTA и LPS на самом деле представляют собой полимеры, состоящие из липидной части и сахаридной части, способной вызывать сильные иммунные ответы и в наиболее серьезных ситуациях вызывать артрит, нефрит, менингит или вызывать лихорадку и шок с последствиями, которые также могут стать смертельными. Это объясняет большое количество зарегистрированных побочных явлений, которые указаны выше.

В дополнение к этому следует также учитывать, что, как упоминалось ранее, MW НА является изменчивой в зависимости от источника и способа получения и определяет ее область применения: например, НА с низкими значениями MW применяют в дерматологических препаратах или лечебно-косметических препаратах для кожи (приблизительно 200 кДа, Connettivina®), тогда как для внутрисуставных применений предпочтительными являются более высокие значения MW (обычно в диапазоне от 700 до 1800 кДа; Hyalgan®, Hyalubrix®, Orthovisc®), НА со значениями MW, достигающими значений выше 1500 кДа, применяют в косметической хирургии или для внутриглазных применений. Тем не менее, применительно к способу очистки важным является удаление фракций НА с MW менее 30000 Да, для которых широко показан сильный воспалительный эффект (EP 0138572), что абсолютно нежелательно, независимо от типа применения.

Это означает, что в процессе промышленной очистки НА необходимо оценивать и контролировать различные факторы:

технологический выход: необходимо экстрагировать максимально возможное количество НА из выбранного источника получения;

промышленное удобство: наилучший продукт должен быть получен с минимальными отходами используемых материалов (реагенты, растворители и т.д.), производя как можно меньшее количество отходов, подлежащих утилизации, и в кратчайшие сроки;

степень чистоты: полученный продукт не должен содержать каких-либо загрязняющих веществ, а также фракций НА с MW <30000 Да, известных как способные вызывать воспалительный каскад.

Степень чистоты, безусловно, зависит от точности стадий очистки.

В уровне техники известны многочисленные попытки обобщения этих требований. Среди множества схематично можно вспомнить приведенное ниже.

EP 0138572: очистка НА из петушиных гребней с использованием, среди прочего, стадий ультрафильтрации, добавление четвертичных солей (цетилпиридиния) и минеральных смол, осаждение этанолом и получение двух фракций с разной MW (50-100 кДа и 500-730 кДа), без вызывающей воспаление фракции; стадии ультрафильтрации в данном случае применяют для удаления всех воспалительных молекул с MW <30000 и для разделения двух необходимых фракций НА.

EP 535200: очистка НА из гребней петухов с помощью стадий засоления четвертичными аминами и последующих стадий осаждения растворителями (этанолом или ацетоном). НА получают с различными значениями MW в диапазоне от 750 до 1230 кДа, без вызывающих воспаление фракций, и они специально предназначены для офтальмологического применения.

US 6489467: очистка НА из *Streptococcus* путем ускоренного окисления с помощью HCl, после-

дующих стадий изменения pH и диафильтрации с получением HA с MW, составляющей приблизительно 1700 кДа.

Choi et al., *Biomaterials Research*, 2014, 18, 1-10: очистка HA из *Streptococcus zooepidemicus* путем ультрафильтрации и осаждения ацетоном. Получают HA со значениями MW в диапазоне от 900 до 1100 кДа.

EP 2870255: очистка HA из *Streptococcus zooepidemicus* с помощью стадий фильтрации (для удаления примесей), ультрафильтрации (для концентрирования продукта внутри раствора, в котором он присутствует), изменения pH и, в заключение, осаждения этанолом с получением MW в диапазоне от 60 до 2400 кДа.

EP 1543103: очистка HA из культур *Streptococcus* путем добавления ароматических смол в предварительно отфильтрованный культуральный бульон, который адсорбирует большую часть примесей, с последующей ультрафильтрацией для концентрирования раствора HA и, в заключение, осаждение этанолом.

WO 2018/020458: очистка HA из культур микроорганизмов рода *Streptococcus* или *Bacillus*, с разделением на фракции, имеющие точную молекулярную массу (92-230 кДа; 450-780 кДа; 920-1450 кДа) путем термической обработки. Очистка включает, помимо прочих фаз, стадии с ароматическими смолами с последующими повторными стадиями фильтрации и, в заключение, осаждение органическим растворителем и соответствующими стадиями промывания.

Хотя с помощью способов, изложенных в данном документе, и способов, обычно применяемых в большинстве случаев, можно получать высококачественную гиалуроновую кислоту и с приемлемыми значениями выхода, они являются чрезвычайно сложными и, следовательно, дорогостоящими с точки зрения применения реагентов, растворителей, фильтров и т.д., с точки зрения времени и, наконец, с точки зрения затрат, которые необходимо понести для удаления отходов переработки.

Настоящее изобретение преодолевает недостатки известного уровня техники благодаря чрезвычайно упрощенному способу очистки натриевой соли гиалуроновой кислоты, который позволяет получать продукт очень высокой чистоты, наряду с удивительной экономией материалов и времени и заметным увеличением значений выхода в промышленном масштабе, которые, как известно, достигают значений, очень близких к 100%.

#### **Подробное описание изобретения**

Объект настоящего изобретения относится к новому способу экстракции гиалуроновой кислоты и ее последующей очистки в форме соли щелочного и/или щелочно-земельного металла, предпочтительно в форме натриевой соли, который характеризуется

очень высоким выходом;

промышленным удобством, благодаря удалению многочисленных промежуточных стадий;

очень высокой степени чистоты конечного продукта, абсолютно без каких-либо загрязняющих веществ.

Способ экстракции гиалуроновой кислоты, разработанный заявителем, является чрезвычайно экономичным, поскольку он обеспечивает строго ограниченное количество рабочих стадий для достижения конечного продукта; это означает экономию не только с точки зрения используемых материалов (растворителей, реагентов, солей, минеральных смол, синтетических смол, фильтров и т.д.), но также и в отношении утилизации отходов переработки: известно, что материалы, используемые в химической промышленности, должны утилизироваться в соответствии с техникой безопасности, например, в случае органических растворителей. Наконец, меньшее количество стадий также соответствует, в этом случае, сокращению времени обработки; сочетание этих факторов приводит к лучшему промышленному удобству. Этот способ может быть применен для очистки HA, полученной в соответствии с любой из многочисленных методик, известных специалистам в данной области. Фактически HA может происходить из биологического источника, в частности из гребней птиц рода *Gallus* (EP 0138572), в результате ферментации *Streptococcus*, в результате молекулярной инженерии с помощью *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium* (EP 2614088, EP 2614087); этот способ предпочтительно применим к HA, полученной в результате ферментации *Streptococcus*, в частности *Streptococcus equi* подвид *equi*, 68222, мутант H-1 (EP 0716688).

Способ, заявленный в данном документе, как показано заявителем далее, позволяет получать HA чрезвычайно высокой чистоты, не только в соответствии со всеми химическими/физическими характеристиками, требуемыми Европейской фармакопеей (Евр. фарм. 5.0 1472), но даже более чистой, в частности, с точки зрения содержания бактериальных эндотоксинов, белков, пирогенов.

Следует помнить собственно, что независимо от источника получения, если конечный продукт не был полностью очищен, он может содержать различные виды загрязняющих веществ, такие как пирогены, белки (происходящие из исходного биологического материала), нуклеиновые кислоты, токсины бактериального происхождения, происходящего либо от грамположительных бактерий (*Streptococcus*, или *Bacillus*, или от *Enterococci* и *Staphylococci*), либо от грамотрицательных бактерий, таких как, например, *Escherichia coli* или *Pasteurella* и *Salmonella*: присутствие этих токсинов, например липотейхоевой кислоты (LTA) или липополисахарида (LPS), в готовом продукте на основе гиалуроновой кислоты делает невозможным его применение из-за высокого риска продуцирования вызывающих сильную реакцию орга-

низма провоспалительных факторов, что, в свою очередь, является причиной воспалений и/или инфекций суставов или тканей, подвергаемых обработке, и в наиболее тяжелых случаях вызывающих их полное разрушение или некроз.

В заключение, выход при осуществлении способа очистки в соответствии с настоящим изобретением чрезвычайно высокий и находится в диапазоне значений от 85 до 100%.

Гиалуроновую кислоту, полученную в соответствии с настоящим изобретением, можно применять с полной безопасностью, особенно во всех инъекционных фармацевтических композициях (внутрисуставных, внутрикожных и внутриглазных), поскольку она не содержит каких-либо провоспалительных и пирогенных компонентов. НА, очищенную с помощью нового способа, объекта настоящего изобретения, предпочтительно полученную в форме соли щелочного или щелочно-земельного металла и еще более предпочтительно в форме натриевой соли, также можно применять при получении всех производных, известных специалистам в данной области, таких как, например, соли НА с тяжелыми металлами (EP 0827514), сложные эфиры (EP 0216453), амиды (EP 1095064), сульфатированные продукты (EP 0940410) и продукты, полученные в результате сшивания, включая продукты, полученные в результате аутосшивания (EP 0341745), НА.

Как уже указывалось, способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять для очистки НА, полученной в соответствии с различными известными методиками, поскольку, как правило, все способы предусматривают некоторые общие стадии, которые можно обобщить как указано далее.

Получение.

В зависимости от выбранного источника происходит расщепление биологического материала или ферментация соответствующим образом идентифицированных микроорганизмов или, опять же, в соответствии с новыми научными исследованиями с использованием биотехнологических процедур. То, что получают, является, по сути, бульоном, сильно загрязненным твердыми биологическими материалами (так называемой биомассой), содержащим в растворе гиалуроновую кислоту и многие другие совершенно нежелательные вещества различных типов. Каждый способ также предусматривает стадии удаления производственных остатков (как твердых, так и, насколько это возможно, растворенных), как правило, путем разделения биомассы с использованием различных способов, чтобы получить отфильтрованные бульоны, содержащие НА, для подвергания последующей стадии экстракции: именно на этой стадии НА выделяют и извлекают из ферментационного бульона. Эта стадия, на которой различные известные способы отличаются наиболее сильно как с точки зрения рабочих способов (реагенты, растворители, фильтры, поверхностно-активные вещества и т.д.), так и с точки зрения количества стадий и, следовательно, с точки зрения затраченного времени. Это, безусловно, самая сложная и требующая осторожности часть способа, поскольку именно на стадии экстракции закладываются основы для степени чистоты готового продукта и выхода при осуществлении способа получения. Результатом осуществления стадии экстракции является, как правило, концентрированный раствор НА, который подвергают так называемой стадии очистки.

Хотя способы очистки также определяются в соответствии с источником происхождения гиалуроновой кислоты, в целом, они соответствуют общим линиям, которые известны специалистам в данной области:

жидкую фазу, содержащую гиалуроновую кислоту в растворе, обрабатывают таким образом, чтобы удалить возможно присутствующие нежелательные элементы (белки, токсины и т.д.);

затем осуществляют осаждение с помощью органических растворителей (таких как этанол, ацетон или их смеси), в которых НА нерастворима;

за этим следуют повторяющиеся стадии растворения осадка в водном носителе и последующие стадии осаждения, солиubilизации, фильтрации и промывания до тех пор, пока не будет получен конечный продукт, который затем высушивают.

Способ очистки в широком смысле (понимаемый как комбинация стадий, начиная с ферментационного бульона, приводящая к конечному продукту) согласно настоящему изобретению сосредоточен на стадии экстракции, которая, независимо от источника НА, в различных известных на сегодняшний день способах нацелена на многочисленные прогоны.

Именно на этой стадии фактически необходимо выделить из бульона максимально возможное количество необходимого продукта (НА), одновременно удаляя максимально возможное количество всех видов примесей, и это объясняет большое количество необходимых рабочих стадий.

Поэтому именно на этой стадии определяют основные параметры, по которым должен оцениваться способ очистки, т.е.

выход, т.е. количество полученного продукта; чистота полученного продукта;

промышленное удобство, т.е. растрата материалов и времени на получение необходимого продукта с необходимыми характеристиками.

Заявитель неожиданно обнаружил, что начиная с бульона, полученного на стадии получения (независимо от того, какой она может быть), посредством сокращенной серии стадий способ экстракции в соответствии с настоящим изобретением позволяет получить из бульона практически всю гиалуроновую кислоту, присутствующую в нем, и указанная НА после соответствующих стадий очистки в соответствии

с известным уровнем техники оказывается чрезвычайно чистой в отношении содержания пирогенов, белков, бактериальных эндотоксинов.

Таким образом, объект настоящего изобретения относится к способу экстракции и очистки НА из ферментационного бульона, предпочтительно из ферментационного бульона микроорганизмов рода *Streptococcus* или *Bacillus*, указанный способ отличается тем, что он включает стадию экстракции, включающую или состоящую из следующих стадий:

a) разбавление отфильтрованного ферментационного бульона очищенной водой в количестве от 1,1 до 3 объемов;

b) принудительная рециркуляция бульона, поступающего из стадии a), образованного объединением пермеата и ретентата внутри касет фильтра тангенциального потока (TFF), содержащих ультрафильтрационные мембраны, изготовленные из арилсульфонового полимерного материала, с пористостью в диапазоне от 5000 до 300000 Да, где принудительную рециркуляцию повторяют в течение времени в диапазоне от 1 до 6 ч, причем указанную рециркуляцию проводят с помощью однонаправленного потока и в замкнутой системе при постоянном объеме без введения жидкостей извне, при этом за стадией b) принудительной рециркуляции следуют нижеуказанные стадии:

c) I диафильтрация ретентата, содержащегося в TFF-касетах из стадии b), раствором для диафильтрации, выбранным из очищенной воды и солевого раствора;

d) концентрирование объема, полученного на стадии c), до объема, равного объему исходного бульона;

e) II диафильтрация объема, полученного на стадии d), раствором для диафильтрации, выбранным из очищенной воды и солевого раствора, при этом повторяют указанную диафильтрацию от 5 до 15 раз;

f) конечного концентрирования объема, полученного на стадии e), до тех пор, пока не будет получен конечный объем, равный трети объема исходного бульона;

g) извлечение продукта, удерживаемого внутри TFF-кассет, путем циркуляции очищенной воды до получения общего объема, равного половине исходного бульона.

Еще один объект настоящего изобретения относится к способу экстракции НА из ферментационного бульона микроорганизмов рода *Streptococcus* или *Bacillus*, причем указанный способ включает или состоит из следующих стадий:

a) разбавление отфильтрованного ферментационного бульона очищенной водой в количестве от 1,1 до 3 объемов;

b) принудительная рециркуляция бульона, поступающего из стадии a), образованного объединением пермеата и ретентата внутри касет фильтра тангенциального потока (TFF), содержащих ультрафильтрационные мембраны, изготовленные из арилсульфонового полимерного материала с пористостью в диапазоне от 5000 до 300000 Да, где принудительную рециркуляцию повторяют в течение времени в диапазоне от 1 до 6 ч, причем указанную рециркуляцию проводят с помощью однонаправленного потока и в замкнутой системе при постоянном объеме без введения жидкостей извне.

Разработанный заявителем способ экстракции позволяет практически полностью экстрагировать и, следовательно, извлекать гиалуроновую кислоту, присутствующую в исходном отфильтрованном бульоне, позволяя достичь значений выхода в диапазоне от 95 до 100%.

Таким образом, такие высокие значения выхода при экстракции приводят к гораздо более высоким значениям выхода конечного продукта, чем было известно до сих пор, поскольку на последующих стадиях осаждения и промывания, типичных для этих способов, единственными потерями НА в количественном выражении являются потери, связанные с технологическими операциями (например, минимальные количества НА остаются прикрепленным к используемому оборудованию); поэтому предполагается, что выход на стадии экстракции строго предсказывает выход всего способа очистки.

Способ экстракции в соответствии с настоящим изобретением имеет преимущество в отношении инновационного применения методики ультрафильтрации (UF). В целом, методика UF является известным способом, который позволяет выделить компонент из жидкой фазы, в которой указанный компонент содержится, и он имеет молекулярную массу выше, чем таковая, которая определяется порами фильтрующей мембраны (предел отсека). Очень схематично, жидкую фазу (исходное сырье), содержащуюся в специальном резервуаре, проталкивают насосом к фильтрационной мембране, снабженной порами, имеющими точные размеры (предел отсека). Жидкость, проходящую через мембрану фильтра, собирают ниже по потоку и получают фильтрат или пермеат, и его удаляют; извлекаемый компонент удерживается на поверхности мембраны и образует ретентат, который содержит представляющий интерес продукт. Чтобы извлечь максимально возможное количество продукта, ретентат подвергают множеству циклов UF, повторно вводят его в резервуар и перенаправляют как исходное сырье в UF-касеты с удалением пермеата, получаемого каждый раз. Поэтапное удаление пермеата, несомненно, приводит к концентрированию из-за потери объема, который затем компенсируется добавлением подходящей жидкости в резервуар. Поэтапное удаление пермеата, несомненно, приводит к потере гиалуроновой кислоты, которую UF-фильтры не могут полностью удерживать.

Чтобы получить как можно более чистый конечный продукт, за циклом следует, как известно специалистам в данной области, одна или более стадий диафильтрации, с введением подходящей жидкости

(раствор для диафильтрации) извне, чтобы создать промывочный поток, который при прохождении через ретентат помогает удалить все еще присутствующие примеси. Когда, как и в случае настоящего изобретения, молекулы биологического происхождения должны быть разделены, при этом, как правило, имеющие значительные размеры с точки зрения молекулярной массы, принятой UF, является так называемая фильтрация тангенциального потока (TFF).

Поэтому заявитель разработал инновационный способ экстракции НА из ферментационного бульона, предпочтительно из ферментационного бульона микроорганизмов рода *Streptococcus* или *Bacillus*, в частности *S. equi*, *B. subtilis* или *B. megaterium*, более предпочтительно *S. equi*, способ, который благодаря инновационному применению методики TFF позволяет практически полностью извлечь гиалуроновую кислоту из бульона, в котором она содержится.

Заявитель на самом деле неожиданно обнаружил, что с помощью предшествующей TFF стадии разбавления и последующей принудительной рециркуляции подлежащего обработке культурального бульона получают практически полное извлечение гиалуроновой кислоты, присутствующей в том же бульоне. Эту принудительную рециркуляцию осуществляют, как подробно объяснено ниже, путем отправки культурального бульона в соответствующие TFF-кассеты, сбора полученного пермеата (а не удаления его, как того требует существующий уровень техники) и после его транспортировки внутрь резервуара, из которого берут исходный бульон, перенаправления его снова на те же TFF-кассеты, внутри которых он будет вести себя как исходное сырье: таким образом, НА, все еще присутствующая в рециркулирующем исходном сырье, будет представлять собой дополнительный ретентат, и постепенно образующийся пермеат будут повторно использовать в цикле, описанном выше (принудительная рециркуляция). Таким образом, на этой стадии ретентат и пермеат объединяют в резервуаре, который содержал исходное сырье, и подвергают рециркуляции с помощью однонаправленного потока. Все это происходит без введения жидкостей извне, что позволяет поддерживать постоянный объем внутри системы, соответственно, в замкнутой системе. Вся система, естественно, оснащена комплектом клапанов, которые регулируют потоки и оттоки, насосами переменного давления для подачи жидкостей, манометрами для контроля значений давления.

Как уже упоминалось выше, описанный набор операций обуславливает практически полное извлечение НА из исходного бульона со значениями выхода в диапазоне от 95 до 100%.

Следовательно, очевидно, что обсуждаемое настоящее изобретение существенно изменяет уровень техники, значительно улучшая выход при осуществлении способа (извлекают большее количество гиалуроновой кислоты) и, каскадно, промышленное удобство (меньшее количество стадий означает меньшие количества используемых материалов, фильтров и т.д. и меньшее количество отходов, подлежащих утилизации).

Более конкретно, рабочий поток, посредством которого осуществляют способ, описанный в настоящем изобретении, начинается, как уже указывалось, с бульона, содержащего НА, и исходящий из любой начальной стадии получения, предпочтительно из ферментации из *Streptococcus*, в частности из ферментации *Streptococcus equi* подвид *equi*, 68222, мутант Н-1 (EP 0716688). В этом конкретном случае бульон доводят до pH в диапазоне от 4,0 до 5,0, предпочтительно до 4,5 с помощью раствора сильной кислоты, предпочтительно HCl, и затем отделяют от биомассы с помощью одной из методик разделения, известных специалистам в данной области (центрифугирование, и/или микрофильтрация, и/или фильтрация через подушки из кизельгура).

Объем отфильтрованного бульона, безусловно, варьирует в зависимости от мощности промышленного предприятия; в этом конкретном случае объем может варьировать от 2000 до 4000 л; способ предпочтительно применяют для партии объемом 3000 л. Затем следует стадия экстракции.

Полученный таким образом бульон последовательно подвергают нижеуказанным стадиям.

а) Разбавление: бульон, поступающий из стадии получения и обработанный, как описано выше, вводят в подходящий резервуар и разбавляют очищенной водой до общего объема в диапазоне от 1,1 до 3 объемов, предпочтительно до объема, который равняется 1,5 объема по сравнению с начальным объемом. Это совершенно инновационный подход, поскольку в соответствии с уровнем техники, исходный бульон концентрируют, поэтому необходимо обрабатывать меньшие объемы.

б) Принудительная рециркуляция: бульон, разбавленный таким образом (исходное сырье), циркулирует при помощи системы, содержащей насос, внутри TFF-кассет, содержащих UF-мембраны, изготовленные из арилсульфонового полимерного материала, предпочтительно полиэфирсульфона, с меняющейся пористостью (предел отсека) в диапазоне от 5000 до 300000 Да, предпочтительно от 50000 до 200000 и еще более предпочтительно с пористостью, которая равняется 100000 Да, без введения раствора для ультрафильтрации и без отведения пермеата, а значит, внутри замкнутой системы. Таким образом, создают принудительную рециркуляцию бульона, при которой вместо того, чтобы удалить пермеат, как это обычно бывает, его повторно вводят в резервуар и объединяют с ретентатом, который постепенно образуется, и его направляют далее к мембране фильтра. Фактически, пермеат, по меньшей мере, для первых циклов содержит не только минеральные соли и различные типы примесей, но и НА в растворе. Принудительная рециркуляция бульона также создает желатиновый слой НА внутри UF-кассеты, который действует как дополнительный фильтр для НА, все еще присутствующей в пермеате, и в то же время

предотвращает засорение системы. Следует отметить, что принудительная рециркуляция и вся система экстракции характеризуются однонаправленным потоком жидкой фазы (исходного сырья и других жидкостей). Принудительную рециркуляцию поддерживают в течение времени в диапазоне от 1 до 6 ч, предпочтительно в течение времени, которое равняется 3 ч, и тестируют с равными промежутками времени, составляющими 30 мин, до тех пор, пока образец пермеата, доведенный с помощью NaCl в порошковой форме до конечной молярности 0,3М NaCl и с добавлением двух объемов этанола, не дает какого-либо осадка (как уже упоминалось, осаждение этанолом является одной из самых простых и самых быстрых методик выделения НА из жидкой фазы). Это означает, что практически вся НА, присутствующая в начальном бульоне, будет сохранена в TFF-кассете внутри ретентата: очевидно, что инновации практически исключают потери продукта, что приводит к огромному преимуществу в производстве.

Выход на стадии экстракции рассчитывали по способу с использованием карбазола (Евр. фарм. 5.0; 1472, 01/2011); вкратце, концентрацию НА, присутствующую в бульоне в конце ферментации, и концентрацию НА, полученную в конце стадии экстракции, определяли способом с использованием карбазола. Более конкретно, рассчитывали соотношение между количеством в граммах НА, экстрагированной в соответствии с тем, что описано, и начальными литрами бульона в конце ферментации; простая пропорция позволяет рассчитать значение выхода, выраженное в процентах экстрагированной НА против исходной НА в бульоне.

Выход на стадии экстракции, разработанной в рамках настоящего изобретения, рассчитанный таким образом, находится в диапазоне от 95 до 100%. Далее следует то, что известно специалистам в данной области; в частности, заявитель приступает к стадиям диафильтрации и предпочтительно, как указано далее.

с) I диафильтрация: пермеат, полученный на предыдущей стадии b), полностью без НА, удаляют через отверстие выпускного клапана. Подача раствора для диафильтрации открыта, и ее поддерживают непрерывной, чтобы создать постоянный поток раствора для диафильтрации через ретентат, в то время как объем, циркулирующий внутри резервуара, поддерживают постоянным за счет удаления постепенно образующегося пермеата. Используемый раствор для диафильтрации может представлять собой очищенную воду или физиологический раствор, предпочтительно очищенную воду. Эту процедуру продолжают в течение времени, необходимого для удаления объема пермеата, равного удвоенному объему, присутствующему в резервуаре в конце стадии принудительной рециркуляции.

d) Концентрирование: при сохранении открытым сбросного патрубка и блокировании подачи раствора для диафильтрации содержимое резервуара концентрируют до тех пор, пока оно не будет возвращено к объемам исходного бульона до первоначального разбавления (следовательно, перед стадией a).

e) II диафильтрация: стадию диафильтрации повторяют в отношении объема, полученного на стадии d), как описано на стадии c), 5-15 раз, предпочтительно 6-12 раз.

Наконец, извлечение НА выполняют в соответствии с известным уровнем техники и предпочтительно посредством конечного концентрирования: применяют ту же процедуру, которая описана в пункте d), до тех пор, пока не будет получен конечный объем, равный приблизительно трети начального объема (до стадии a).

И последнее извлечение: продукт, удерживаемый внутри кассет, извлекают путем циркуляции очищенной воды до тех пор, пока не будет получен объем, равный половине объема бульона до начального разбавления (следовательно, перед стадией a).

В этот момент НА, присутствующую в растворе, полученном в результате осуществления способа, описанного выше, переводят на стадию специфической очистки, которая соответствующим образом выбрана специалистом в данной области, так как это известная технология, и на последующую стадию высушивания.

Вкратце, объект настоящего изобретения относится к высокоэффективной процедуре экстракции НА с точки зрения выхода, чистоты продукта и промышленного удобства при применении в общем способе экстракции и очистки НА, полученной путем ферментации из микроорганизмов рода *Streptococcus* или *Bacillus*, в частности *S. equi*.

Его совершенно инновационная особенность заключается в том, что TFF предшествует стадия разбавления и принудительная рециркуляция культурального бульона, подлежащего обработке; эта процедура может быть успешно применена в рамках любого известного общего способа получения и очистки НА, независимо от источника НА, способа обработки этого источника и способа, с помощью которого достигают конечного продукта в высушенном виде, готового для применения, для которого оно предназначено.

Более конкретно, заявитель утверждает, что процедура экстракции НА с высоким выходом, начиная с бульона, полученного в соответствии с известными методиками, в частности полученного путем ферментации из *Streptococcus*, более предпочтительно путем ферментации *Streptococcus equi* подвид *equi*, 68222, мутант H-1 (EP 0716688), включает нижеуказанные стадии или состоит из них.

Экстракция:

a) разбавление: отфильтрованный полученный бульон разбавляют очищенной водой до объема в диапазоне от 1,1 до 3 объемов, предпочтительно до объема, который равняется 1,5 по отношению к на-



чальному объему;

b) принудительная рециркуляция: бульон, выходящий из стадии а), образованный объединением ретентата и пермеата, подвергают принудительной рециркуляции внутри кассет с фильтром тангенциального потока (TFF), содержащих ультрафильтрационные мембраны из арилсульфонового полимерного материала, предпочтительно полиэфирсульфона, с пористостью в диапазоне от 5000 до 300000 Да, предпочтительно от 50000 до 200000 и еще более предпочтительно с пористостью, которая равняется 100000 Да. Принудительную рециркуляцию повторяют в течение времени в диапазоне от 1 до 6 ч, предпочтительно в течение времени, которое равняется 3 ч, до полного задержания НА внутри ретентата, причем указанную рециркуляцию проводят с помощью однонаправленного потока и в замкнутой системе при постоянном объеме без введения жидкостей извне.

Затем применяют процедуру в соответствии с тем, что известно специалистам в данной области, в частности, со стадиями диафильтрации, и предпочтительно, как указано далее:

c) I диафильтрация: выполняют с помощью раствора для диафильтрации, выбранного из очищенной воды и солевого раствора, предпочтительно из очищенной воды, и продолжают в течение времени, необходимого для удаления объема пермеата, равного удвоенному объему, присутствующему в резервуаре после предыдущей стадии b);

d) концентрирование: содержимое резервуара концентрируют до объема исходного бульона (до стадии а);

e) II диафильтрация: диафильтрацию в соответствии с тем, что описано на стадии c), повторяют 5-15 раз, предпочтительно 6-12 раз, для объема, полученного на стадии d);

f) конечное концентрирование: объем, полученный на стадии e) концентрируют до тех пор, пока не будет получен объем, равный трети начального объема (до стадии а);

g) извлечение: продукт, удерживаемый внутри кассет, извлекают циркуляцией очищенной воды до полного объема, равного половине бульона перед стадией а).

После того как все стадии, описанные в данном документе, выполнены, так называемые стадии очистки выполняют с применением методик, известных специалистам в данной области; только в качестве примера можно упомянуть обработку сильными щелочными или щелочно-земельными основаниями, предпочтительно щелочными, и в частности NaOH, чтобы исключить любые дополнительные возможные загрязнители, с последующими стадиями фильтрации (например, на каменном угле, и/или на фильтровальной ткани, и/или на полипропилене), стадиями осаждения в органических растворителях, таких как, например, этанол, с различными разбавлениями, и, в заключение, стадиями промывания в органических растворителях (предпочтительно в этаноле); среди различных способов очистки особенно предпочтительны те, которые описаны в примере 3 WO 2018/020458, составной части настоящего изобретения.

Независимо от выбранного способа очистки НА получают в виде соли, предпочтительно в форме натриевой соли.

Очищенную таким образом НА в виде соли затем подвергают высушиванию, что обеспечивает ее оптимальную сохранность, перед использованием для путей применения, для которых она предназначена.

Полученный таким образом продукт не только соответствует параметрам Европейской Фармакопеи (Евр. фарм. 5.0; 1472), но даже лучше с точки зрения содержания бактериальных эндотоксинов и белков.

Конечный выход при осуществлении способа, рассчитанный согласно ранее описанному способу с использованием карбазола (Евр. фарм. 5.0; 1472), подтверждает, что потеря продукта является минимальной на этой фазе и из-за эксплуатационных ограничений; фактически выход попадает в диапазон от 85 до 100%, предпочтительно от 95 до 100%.

Пример 1. Экстракция НА из ферментационного бульона *Streptococcus equi*.

3000 л ферментационного бульона *Streptococcus equi* подвид *equi*, 68222, мутант Н-1 доводили до рН 4,5 добавлением 1н. раствора HCl при перемешивании и затем отбирали биомассу путем фильтрации через подушки целита (диатомовый кизельгур).

Обработанный таким образом бульон затем разбавляли 1500 л очищенной воды до конечного объема 4500 л и помещали в реактор с подходящей емкостью (6000 л).

Полученный объем бульона подвергали стадии принудительной рециркуляции с использованием TFF-кассет (Pall, модель Omega), снабженных полиэфирсульфовыми мембранами с пористостью (пределом отсечения), которая равняется 100000 Да. Исходное сырье подавали в кассеты с давлением на входе не выше 2,5 бар, создаваемым насосом. Принудительную рециркуляцию продолжали в течение 3 ч, с 30-минутными интервалами, проводили анализ для оценки присутствия НА в пермеате: 32 мл NaCl и два объема этанола добавляли к 2 мл пермеата. По истечении 3 ч принудительной рециркуляции проверка давала отрицательный результат, т.е. осадок не образовывался, а это означает, что НА полностью удерживалась в ретентате.

Принудительную рециркуляцию останавливали и выход рассчитывали согласно способу с использованием карбазола, описанному выше, который равняется 98%. Затем начинали первую стадию диафильтрации при постоянном объеме путем введения очищенной воды в сборный резервуар в течение

времени, необходимого для прохождения через UF-кассеты количества воды, равного 9000 л, таким образом равного удвоенному объему, присутствующему в резервуаре. На этой стадии выпускной клапан открывали и удаляли 9000 л пермеата в специальный контейнер для утилизации.

Объем ретентата теперь концентрировали до исходного объема (3000 л), прекращая подачу очищенной воды, в то время как сбросный патрубок оставляли открытым.

Диафильтрацию повторяли с очищенной водой до удаления в целом 24000 л пермеата, таким образом, завершая 8 циклов диафильтрации.

Кроме того, на конечную концентрацию раствора влияла остановка подачи очищенной воды объемом до 1000 л. Затем продукт извлекали очищенной водой: при закрытом выпускном клапане 500 л воды добавляли в резервуар последовательными фракциями. Вода циркулировала внутри системы, при этом непрерывно извлекали ретентат и повторно вводили его как исходное сырье, чтобы отделить все количество НА, содержащееся в TFF-кассетах и прилипшее к стенкам системы; таким образом получали конечный объем 1500 л, который являлся оптимальным для последующих стадий очистки, причем указанную очистку проводили в соответствии с тем, что описано в примере 3 WO 2018/020458, до получения конечного продукта, гиалуроновой кислоты в форме натриевой соли в виде сухого порошка.

Более конкретно, 0,2M NaOH в воде добавляли к извлеченному продукту и всю смесь затем нейтрализовали 12н. HCl до тех пор, пока pH не дойдет до 8,5, и в заключение фильтровали через полипропиленовый фильтр. Раствор НА, теперь в форме натриевой соли, осаждали абсолютным этанолом и перемешивали в течение 30 мин. Продукту давали осесть в течение 10 мин и супернатант удаляли сифонированием. Продукт промывали смесью этанол:вода (80:20) при непрерывном перемешивании в течение 30 мин, а затем супернатант удаляли сифонированием. Последнее промывание выполняли абсолютным этанолом, который окончательно удаляли фильтрацией. Полученный продукт помещали в специальные лотки из нержавеющей стали и сушили в течение по меньшей мере 22 ч при температуре 25°C в вакууме.

Анализ конечного продукта:

содержание белка: <0,1%, соответствует Евр. фарм. 5.0, 1472,

содержание бактериальных эндотоксинов: <0,05%, соответствует Евр. фарм. 5.0, 1472,

выход: 96,2%.

Из данных, представленных в данном документе, ясно видно, что внедрение способа экстракции, цели настоящего изобретения в рамках способа получения, экстракции и очистки гиалуроновой кислоты путем ферментации микроорганизмов, известных из уровня техники, неожиданно увеличивает выход при осуществлении способа в целом, что позволяет значительно повысить его эффективность по сравнению с тем, что известно на современном уровне техники. В связи с этим следует помнить, что в целом выход при осуществлении известных способов, считающихся особенно эффективными, установлен между 60 и 80%.

Введение стадии или способа экстракции, разработанного заявителем, также делает весь способ более удобным в с промышленной точки зрения; стадии добавления комплексообразующих солей или адсорбирующих смол, стадии фильтрации на тканях или фильтрах, повторные фазы солюбилизации и осаждения органическими растворителями фактически исключены, что приводит к чистой экономии как с точки зрения времени обработки, так и использования материалов и, в заключение, также с точки зрения отходов, подлежащих утилизации.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ экстракции и очистки гиалуроновой кислоты из ферментационного бульона микроорганизмов рода *Streptococcus* или *Bacillus*, отличающийся тем, что он включает стадию экстракции, включающую или состоящую из следующих стадий:

a) разбавление отфильтрованного ферментационного бульона очищенной водой в количестве от 1,1 до 3 объемов;

b) принудительная рециркуляция бульона, поступающего из стадии a), образованного объединением ретентата и пермеата, внутрь кассет фильтра тангенциального потока (TFF), содержащих ультрафильтрационные мембраны, изготовленные из арилсульфонового полимерного материала с пористостью в диапазоне от 5000 до 300000 Да, где принудительную рециркуляцию повторяют в течение времени в диапазоне от 1 до 6 ч, причем указанную рециркуляцию проводят с помощью однонаправленного потока и в замкнутой системе при постоянном объеме без введения жидкостей извне,

при этом за стадией b) принудительной рециркуляции следуют нижеуказанные стадии:

c) I диафильтрация ретентата, содержащегося в TFF-кассетах из стадии b), раствором для диафильтрации, выбранным из очищенной воды и солевого раствора;

d) концентрирование объема, полученного на стадии c), до объема, равного объему исходного бульона;

e) II диафильтрация объема, полученного на стадии d), раствором для диафильтрации, выбранным из очищенной воды и солевого раствора, при этом повторяют указанную диафильтрацию от 5 до 15 раз;

f) конечное концентрирование объема, полученного на стадии e), до тех пор, пока не будет получен

конечный объем, равный трети объема исходного бульона;

г) извлечение продукта, удерживаемого внутри TFF-кассет, путем циркуляции очищенной воды до получения общего объема, равного половине исходного бульона.

2. Способ по п.1, где выход гиалуроновой кислоты при осуществлении способа находится в диапазоне от 85 до 100%.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, где очищенная гиалуроновая кислота имеет общее содержание белка  $<0,1\%$  и содержание бактериальных эндотоксинов  $<0,05\%$ .

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ферментационный бульон представляет собой ферментационный бульон *Streptococcus equi* подвид *equi* 68222, мутант Н-1.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где очищенная гиалуроновая кислота находится в форме соли щелочных или щелочно-земельных металлов.

6. Способ экстракции гиалуроновой кислоты из ферментационного бульона микроорганизмов рода *Streptococcus* или *Bacillus*, причем указанный способ включает или состоит из следующих стадий:

а) разбавление отфильтрованного ферментационного бульона очищенной водой в количестве от 1,1 до 3 объемов;

б) принудительная рециркуляция бульона, поступающего из стадии а), образованного объединением ретентата и пермеата, внутрь кассет фильтра тангенциального потока (TFF), содержащих ультрафильтрационные мембраны, изготовленные из арилсульфонового полимерного материала с пористостью в диапазоне от 5000 до 300000 Да, где принудительную рециркуляцию повторяют в течение времени в диапазоне от 1 до 6 ч, причем указанную рециркуляцию проводят с помощью однонаправленного потока и в замкнутой системе при постоянном объеме без введения жидкостей извне.

7. Способ по п.6, где ферментационный бульон представляет собой ферментационный бульон *Streptococcus equi* подвид *equi*, 68222, мутант Н-1.

