



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102019000019724</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>24/10/2019</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>24/04/2021</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
C	08	B	37	08

Titolo

?PROCEDIMENTO IN SOLVENTE ORGANICO PER LA PURIFICAZIONE DELL?ACIDO  
IALURONICO SALE SODICO?

11461M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

GB/ta **“PROCEDIMENTO IN SOLVENTE ORGANICO PER LA PURIFICAZIONE DELL’ACIDO IALURONICO SALE SODICO”**

a nome : **BMG PHARMA S.p.A.**

con sede in: Via Confalonieri, 29 - 20124 Milano

\* \* \*

La presente invenzione si riferisce ad un procedimento per la preparazione di acido ialuronico, o un suo sale, di grado farmaceutico, iniettabile od oftalmico per utilizzo nel campo dermocosmetico, farmaceutico o dei dispositivi medici che comprende la dissoluzione di acido ialuronico o un suo sale in solvente organico, un ciclo termico e un recupero del prodotto mediante precipitazione e successivi lavaggi in solventi organici.

La presente invenzione descrive il procedimento per la purificazione dell’acido ialuronico (HA) o un suo sale mediante un trattamento termico in ambiente organico che permette sorprendentemente di rimuovere sia i batteri che le endotossine, ossia i lipopolisaccaridi presenti nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi responsabili di una risposta infiammatoria in vivo, e di preservare l’acido ialuronico nativo dalla degradazione della catena polisaccaridica indotta da idrolisi. L’acido ialuronico preparato con tale processo ha un profilo microbiologico compatibile con acidi ialuronici di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico. Il processo presenta vantaggi sotto l’aspetto chimico e biologico evitando il verificarsi di fenomeni idrolitici degradativi in quanto condotto in solvente organico non acquoso. Il processo ha inoltre un ridotto impatto ambientale ed economico perché non richiede gli elevati volumi tipici delle procedure esistenti e permette il completo recupero

dei solventi per un loro riutilizzo. Infine, l'estrema semplicità del processo, che non prevede nessuna tecnica costosa di filtrazione, diafiltrazione o scambio ionico, incide in maniera estremamente positiva sul costo, ampliando quindi le possibili applicazioni economicamente sostenibili di un sodio ialuronato con un elevato grado di purezza aumentando, di conseguenza, la sicurezza di prodotti contenenti tale polisaccaride, solitamente destinati ad un uso su umano.

### **Stato dell'arte**

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano costituito da unità ripetitive di acido glucuronico e N-acetilglucosammina legati tra di loro, alternativamente, da legami glicosidici  $\beta 1 \rightarrow 4$  e  $\beta 1 \rightarrow 3$ . È un elemento essenziale del tessuto connettivo ed è anche presente nel liquido sinoviale, nell'umor vitreo e nel cordone ombelicale.

L'acido ialuronico è stato isolato da Karl Meyer e John Palmer nel 1934 e ha numerosi impieghi a livello topico, iniettabile in impianti (subcutanei o intraarticolari), e in campo oftalmico. La carica microbiologica ammissibile è funzione dell'applicazione finale dell'acido ialuronico: per applicazioni topiche o su mucose esterne, si utilizza il cosiddetto "grado cosmetico" con un limite, definito Total Aerobic Microbic Count (TAMC) e Total Yeast and Mould Count (TYMC), del numero delle colonie batteriche e dei lieviti e muffe (fino a  $10^3$  unità formanti colonia per grammo, o CFU/g), mentre il limite di unità endotossiniche non viene definito; per applicazioni più invasive, si utilizza il grado "farmaceutico", "oftalmico" o "iniettabile" con limiti più stringenti in termini di carica batterica e un contenuto di endotossine inferiore a 0,5 EU/mg per applicazioni parenterali e 0,05 EU/mg per applicazioni intraarticolari o intraoculari. Viste le numerose applicazioni dell'acido

ialuronico in campo oftalmico e come iniettabile, subdermico o articolare, è ovvia l'importanza che riveste la ricerca di metodi di purificazione dell'acido ialuronico che siano semplici, affidabili ed economici.

WO2013/132506 descrive un metodo di purificazione da endotossine mediante trattamento con bentonite e filtrazione su carbone attivo; WO00/44925 riporta un metodo di filtrazione tangenziale seguito da una filtrazione sterilizzante, mentre US2018/014041 utilizza tecniche di diafiltrazione su soluzioni molto diluite; CA02225866 prevede l'utilizzo di resine cariche negativamente utilizzate in sequenza. Tutti questi processi presentano una elevata complessità e utilizzano strumentazioni e apparecchiature estremamente costose (impianti di ultrafiltrazione, colonne di scambio, liofilizzatori) che li rendono difficilmente applicabili ad un procedimento industriale che non sia estremamente costoso. Nel caso di soluzioni diluite (US2018/014041) i volumi necessari hanno anche un elevato impatto ambientale.

EP 2865395 descrive un ciclo termico in acqua seguito da una filtrazione sterilizzante. Le tempistiche descritte, da 1 a 6 giorni, limitano il potenziale del processo vista la sensibilità dell'acido ialuronico alla degradazione idrolitica in funzione della temperatura.

EP2039777 utilizza il processo di estrazione in solvente organico. Prevede un procedimento in fase eterogenea che impone un elevato rischio di inefficacia vista la difficoltà di eliminare in maniera esaustiva le impurezze microbiologiche intrappolate dentro il solido amorfo costituito dall'acido ialuronico, seppure rigonfiato.

US5,079,236, infine, descrive la preparazione di un formulato iniettabile

partendo da un acido ialuronico già microbiologicamente puro mediante il dissolvimento in acqua ad un'opportuna concentrazione in presenza di conservanti parabenici. In questo caso non è descritto un vero e proprio processo di purificazione bensì un processo di conservazione con ingredienti che possono avere delle controindicazioni in termini di sicurezza, in particolare nel caso di dispositivi medici iniettabili.

In generale, tutti i processi noti prevedono l'impiego di impianti di difficile realizzazione in processi industriali sia per la complessità tecnologica che per l'elevato costo. Inoltre questi processi utilizzano elevati volumi di solvente, acquoso ed organico, con ripercussione sui costi di smaltimento, di recupero e sull'impatto ambientale.

Inoltre, considerato che: tutti i processi sono condotti in acqua o in miscele acquose e organiche, hanno tempi elevati e temperature superiori a quella ambientale, tali processi hanno effetti negativi a livello del peso molecolare dell'acido ialuronico a causa di fenomeni degradativi idrolitici.

Infine, non è mai descritto un processo che preveda l'impiego di un acido ialuronico o di un suo sale di grado cosmetico e che ne aumenti il grado di purezza microbiologica ad un profilo compatibile con acidi ialuronici di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico.

E' stato ora trovato un processo che permette di ottenere acido ialuronico o un suo sale partendo dal prodotto con grado di purezza microbiologica inferiore (cosmetico) e ottenere un prodotto con un profilo microbiologico compatibile con acidi ialuronici di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico.

Il procedimento della presente invenzione, essendo condotto in fase omogenea in solvente organico, permette di superare la complessità dei processi

esistenti. L'efficienza del processo limita i volumi di solventi con un effetto positivo a livello economico ed ambientale. L'utilizzo di sistemi non acquosi evita i tipici fenomeni degradativi di idrolisi che inficiano i processi standard. La possibilità di partire da un acido ialuronico o un suo sale con grado di purezza microbiologica inferiore (cosmetico) e di ottenere un grado microbiologico di purezza superiore incrementa esponenzialmente la versatilità del processo in quanto: non è legato ad un processo fermentativo, incrementa il valore del substrato di partenza mediante un processo economicamente vantaggioso con ridotto impatto ambientale, permette potenzialmente di ottenere diversi livelli di purezza microbiologica dallo stesso materiale di partenza permettendone l'utilizzo in campi applicativi di diversa invasività, con ovvie ripercussioni in termini di efficienza, sicurezza ed economicità.

### **Descrizione dell'invenzione**

Oggetto della presente invenzione è un procedimento per la preparazione di acido ialuronico, o un suo sale, di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico, comprendente gli stadi di:

- a) dissolvere l'acido ialuronico o un suo sale ad una temperatura tra 50°C e 100°C in un solvente scelto tra dimetilformammide, dimetilacetammide, N-metilpirrolidone, formammide, e mantenere la soluzione sotto agitazione a detta temperatura per un periodo da 1 ora a 48 ore;
- b) abbassare la temperatura a temperatura ambiente e mantenere la soluzione sotto agitazione da 1 ora a 48 ore;
- c) precipitare l'acido ialuronico o un suo sale per aggiunta di un solvente scelto tra un (C1-C4) alchil alcol, quale metanolo o

isopropanolo, oppure acetone;

d) eliminare le impurezze e gli eventuali sottoprodotti mediante una serie di lavaggi in una miscela tra acqua e un solvente scelto tra un (C1-C4) alchil alcol, quale metanolo o isopropanolo, oppure acetone.

Per grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico si intende acido ialuronico o un suo sale con un profilo microbiologico tale da soddisfare i requisiti riportati in farmacopea per il corrispondente grado di purezza.

Preferibilmente, l'acido ialuronico o un suo sale, di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico preparato secondo il procedimento dell'invenzione ha un valore massimo di  $10^2$  CFU/g e con un contenuto di endotossine inferiore a 0,5 EU/mg.

Il sale dell'acido ialuronico è un sale accettabile per uso farmaceutico, cosmetico o in dispositivi medici quale il sale di sodio, potassio, litio o ammonio quaternario, per esempio tetrabuttilammonio, preferibilmente il sale di sodio.

Lo stadio a) è preferibilmente condotto ad una temperatura variabile tra 80°C e 100°C.

Preferibilmente il solvente utilizzato nello stadio a) è formammide.

Preferibilmente il solvente utilizzato per la precipitazione dello stadio c) è acetone.

Il prodotto precipitato ottenuto nello stadio c) è preferibilmente lavato con un solvente scelto tra isopropanolo o metanolo, preferibilmente metanolo, e filtrato.

L'acido ialuronico o un suo sale utilizzato nel procedimento ha

preferibilmente un peso molecolare ponderale compreso tra  $10^3$  e  $10^6$  Dalton.

Il procedimento dell'invenzione permette di ottenere acido ialuronico o un suo sale partendo dal prodotto con grado di purezza microbiologica inferiore (ad es. cosmetico) e ottenere un prodotto compatibile con un'applicazione iniettabile (mesodermica, subdermica o intraarticolare), farmaceutica od oftalmica.

In genere l'acido ialuronico di partenza è di grado cosmetico.

Per aumentare il grado di purificazione del prodotto gli stadi a), b), c), e d) del procedimento dell'invenzione possono essere ripetuti almeno 1 volta.

L'acido ialuronico, o il suo sale, ottenuto tramite il procedimento dell'invenzione ha un profilo microbiologico compatibile per un utilizzo in formulazioni farmaceutiche, dermocosmetiche, o in dispositivi medici.

L'acido ialuronico ottenuto attraverso il procedimento dell'invenzione può essere utilizzato in formulazioni farmaceutiche, dermocosmetiche comprendenti l'acido ialuronico o un suo sale accettabile, di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico per utilizzo nel campo dermocosmetico, farmaceutico, in dispositivi medici o come integratore da solo o con almeno un eccipiente e/o agente veicolante accettabile per uso farmaceutico dermocosmetico o come dispositivo medico.

## **ESEMPI**

### **Metodi**

#### **Misura del livello endotossinico (Test LAL)**

La quantificazione delle endotossine è stata condotta utilizzando il metodo EU PHARMA 0172018.20614 corrispondente a USP 41 NF 36 2018 par 85-161.

L'acido ialuronico sale sodico grado cosmetico utilizzato per le seguenti prove sperimentali possiede un livello endotossinico valutato con il metodo sopra indicato di 0,82 EU/mg.

**Esempio 1: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 1500 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 1h; stadio b) 25°C: 19h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 10 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico con peso molecolare di 1500 kDa. La miscela è stata termostata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 1 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 19 h alla stessa temperatura.

In seguito sono stati aggiunti 2,6 g di cloruro di sodio disciolto in 14 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,36 EU/mg.

**Esempio 2: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 300 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 1h; stadio b) 25°C: 19h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 10 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico

con peso molecolare di 300 kDa. La miscela è stata termostata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 1 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 19 h alla stessa temperatura.

In seguito sono stati aggiunti 2,6 g di cloruro di sodio disciolto in 14 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,27 EU/mg.

**Esempio 3: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 25 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 1h; stadio b) 25°C: 19h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 20 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico con peso molecolare di 25 kDa. La miscela è stata termostata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 1 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 19 h alla stessa temperatura.

In seguito sono stati aggiunti 4 g di cloruro di sodio disciolto in 20 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva

filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,38 EU/mg.

**Esempio 4: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 1500 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 1h; stadio b) 25°C: 43h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 5 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico con peso molecolare di 1500 kDa. La miscela è stata termostata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 1 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 43 h alla stessa temperatura.

In seguito sono stati aggiunti 2,6 g di cloruro di sodio disciolto in 28 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,15 EU/mg.

**Esempio 5: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 300 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 1h; stadio b) 25°C: 43h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 10 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico con peso molecolare di 300 kDa. La miscela è stata termostatata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 1 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 43 h alla stessa temperatura.

In seguito sono stati aggiunti 2,6 g di cloruro di sodio disciolto in 28 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,14 EU/mg.

**Esempio 6: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 25 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 1h; stadio b) 25°C: 43h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 20 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico con peso molecolare di 25 kDa. La miscela è stata termostatata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 1 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione

per 43 h alla stessa temperatura.

In seguito sono stati aggiunti 4 g di cloruro di sodio disciolto in 35 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,15 EU/mg.

**Esempio 7: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 300 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 43h; stadio b) 25°C: 1h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 10 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico con peso molecolare di 300 kDa. La miscela è stata termostatata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 43 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e sono stati aggiunti 2,6 g di cloruro di sodio disciolto in 28 ml di acqua di grado iniettabile la miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 1 h alla stessa temperatura.

Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa

a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine <0,05 EU/mg.

**Esempio 8: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 25 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 1h; stadio b) 25°C: 43h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 300 ml di formammide, seguiti da 6 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico con peso molecolare di 25 kDa. La miscela è stata termostata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 1 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 43 h alla stessa temperatura.

In seguito sono stati aggiunti 3 g di cloruro di sodio disciolto in 15 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,12 EU/mg.

**Esempio 9: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 300 kDa di grado farmaceutico: (stadio a) 95°C: 17h; stadio b) 25°C: 1h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 200 ml di formammide, seguiti da 20 g di acido ialuronico sale sodico di grado cosmetico

con peso molecolare di 300 kDa. La miscela è stata termostatata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 17 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C.

In seguito sono stati aggiunti 2,6 g di cloruro di sodio disciolto in 28 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,20 EU/mg.

**Esempio 10: Preparazione di acido ialuronico sale sodico MW 300 kDa di grado farmaceutico: ripetizione processo di purificazione (stadio a) 95°C: 17h; stadio b) 25°C: 1h)**

In un pallone a tre colli da 500 ml sono stati introdotti 100 ml di formammide, seguiti da 10 g di acido ialuronico così come ottenuto dall'esempio 9. La miscela è stata termostatata a 95°C e mantenuta sotto agitazione a temperatura costante per 17 h. La temperatura è stata quindi abbassata a 25°C e sono stati aggiunti 1.3 g di cloruro di sodio disciolto in 14 ml di acqua di grado iniettabile, quindi la miscela è stata lasciata sotto agitazione per circa 1 h. Il prodotto è stato isolato per precipitazione in acetone e successiva filtrazione.

Il prodotto è stato sottoposto a diversi lavaggi con metanolo ognuno

seguito da una filtrazione a pressione ridotta. Il precipitato è stato essiccato a pressione ridotta a temperatura ambiente per circa 16 h all'interno di una cappa a flusso laminare.

Un campione di prodotto di 5g sottoposto al test LAL è risultato avere un contenuto di endotossine di 0,09 EU/mg.

## **RIVENDICAZIONI**

1.      Procedimento per la preparazione di acido ialuronico o un suo sale, di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico, comprendente gli stadi di:
  - a)    dissolvere l'acido ialuronico o un suo sale ad una temperatura tra 50°C e 100°C in un solvente scelto tra dimetilformammide, dimetilacetammide, N-metilpirrolidone, formammide e mantenere la soluzione sotto agitazione a detta temperatura per un periodo da 1 ora a 48 ore;
  - b)    abbassare la temperatura a temperatura ambiente e mantenere la soluzione sotto agitazione da 1 ora a 48 ore;
  - c)    precipitare l'acido ialuronico o un suo sale per aggiunta di un solvente scelto tra un (C1-C4) alchil alcol, quale metanolo o isopropanolo, oppure acetone;
  - d)    eliminare le impurezze e gli eventuali sottoprodotti mediante una serie di lavaggi in una miscela tra acqua e un solvente scelto tra un (C1-C4) alchil alcol, quale metanolo o isopropanolo, oppure acetone.
  
2.      Il procedimento secondo la rivendicazione 1 in cui acido ialuronico o un suo sale, di grado farmaceutico, iniettabile o oftalmico è acido ialuronico o un suo sale con un valore massimo di 10<sup>2</sup> CFU/g e con un contenuto di endotossine inferiore a 0,5 EU/mg.
  
3.      Il procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui la temperatura dello stadio a) varia tra 80°C e 100°C.
  
4.      Il procedimento secondo ciascuna delle precedenti rivendicazioni in cui il solvente utilizzato nello stadio a) è formammide.
  
5.      Il procedimento secondo ciascuna delle precedenti rivendicazioni in cui

il solvente utilizzato nello stadio c) per la precipitazione è acetone.

6. Il procedimento secondo ciascuna delle precedenti rivendicazioni in cui il prodotto precipitato ottenuto nello stadio c) è lavato con un solvente scelto tra isopropanolo o metanolo e filtrato.

7. Il procedimento secondo la rivendicazione 6 in cui il prodotto precipitato ottenuto nello stadio c) è lavato con metanolo e filtrato.

8. Il procedimento secondo ciascuna delle precedenti rivendicazioni in cui gli stadi a), b), c) e d) sono ripetuti almeno 1 volta.

Milano, 24 Ottobre 2019