

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235053**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420924**

(22) Data zgłoszenia: **21.03.2017**

(51) Int.Cl.

C12P 19/26 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania kwasu hialuronowego

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

24.09.2018 BUP 20/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

18.05.2020 WUP 05/20

(73) Uprawniony z patentu:

**BIOLOGISTYKA SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Stare Miasto, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**TOMASZ KAPELA, Łódź, PL
TOMASZ GRABOWSKI, Tczew, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Adam Pawłowski

PL 235053 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu hialuronowego.

Kwas hialuronowy jest śluzowatym, liniowym heteropolisacharydem należącym do grupy glikozaminoglikanów o masie cząsteczkowej w zakresie zazwyczaj od 50000 do 8000000 Da. Łańcuch polimerowy kwasu hialuronowego jest złożony z naprzemiennie występujących jednostek kwasu D-glukuronowego oraz N-acetylo-D-glukozaminy, które są połączone ze sobą za pomocą naprzemiennie występujących wiązań 1–3 oraz 1–4 glikozydowych. Kwas hialuronowy w roztworach wodnych stanowi konformację sztywnej lewoskrętnej helisy, która jest stabilizowana za pośrednictwem mostków wodorowych.

Kwas hialuronowy znajduje bardzo szerokie zastosowanie w rozmaitych dziedzinach medycyny oraz kosmetologii, między innymi w okulistyce, dermatologii, radioterapii, reumatologii, ginekologii czy chirurgii. W okulistyce, kwas hialuronowy stosuje się między innymi, w chirurgii zaćmy, rogówki, jaskry, tylnego odcinka oka, zeza i urazów. W dermatologii stosuje się go między innymi w leczeniu oparzeń i blizn, jako matrycę do autologicznych przeszczepów skóry, jako leki wspomagające leczenie owrzodzeń czy uzupełnianiu ubytków tkanki podskórnej wynikających z terapii przeciwwirusowej u chorych na AIDS. W radioterapii kwas hialuronowy jest wykorzystywany między innymi jako krem zmniejszający częstość reakcji zapalnych po naświetleniach raków głowy, szyi, piersi i narządów miednicy. W reumatologii i ortopedii stosowanie kwasu hialuronowego pozwala między innymi na łagodzenie objawów choroby zwyrodnieniowej i reumatoidalnego zapalenia stawów, zmniejszając ból i poprawiając motorykę stawów lub również jako matryca do przeszczepów chrząstki. W ginekologii kwas hialuronowy może być wykorzystywany między innymi do leczenia uszkodzeń spowodowanych zabiegami chirurgicznymi, jako matryca do leków ginekologicznych oraz jako środek poprawiający gojenie się zmian w pochwie po napromieniowaniu. W chirurgii kwas hialuronowy aplikuje się na rany, dzięki czemu uzyskuje się szybsze gojenie ran oraz łagodniejsze bliznowacenie. Ponadto hialuronowy może być stosowany w zapobieganiu zrostów po operacjach jamy brzusznej czy korekcji defektów twarzy.

Kwas hialuronowy występuje naturalnie we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych kręgowców, a jego najwyższe stężenia występują przykładowo w mięśniu sercowym i zastawkach wsierdza, pępowinie, cieple szklistym oka, płynie okołostawowym oraz błonie śluzowej jamy ustnej.

Związek ten jest również syntetyzowany przez organizmy niższe – wchodzi w skład otoczek ścian komórkowych bakterii, przykładowo *Streptococcus pyogenes*, *Aerobacter aerogenes* oraz *Pasteurella*. Kwas hialuronowy pochodzenia bakteryjnego ma identyczny skład z kwasem hialuronowym pochodzącym od organizmów wyższych, co uniemożliwia organizmowi gospodarza uruchomienia mechanizmów obronnych, takich jak proces fagocytozy czy uczynnienie układu dopełniacza wobec czynnika wirulencji jakim jest kwas hialuronowy pochodzenia bakteryjnego. Dzięki temu bakteryjny kwas hialuronowy może być wykorzystywany w medycynie czy kosmetologii.

W praktyce, podstawowym sposobem otrzymywania kwasu hialuronowego jest jego izolacja z tkanek organizmów zwierzęcych, przykładowo ze skóry rekina, oczu bydłęcych, pępowiny, płynu stawowego kurczaków, a w szczególności z grzebieni kogucich. Niemniej jednak, kwas hialuronowy występuje naturalnie w organizmach zwierzęcych w formie kompleksu z innymi biopolimerami, przykładowo białkami, które zanieczyszczając preparaty kwasu hialuronowego wykazują działanie alergenne. Z tego względu, istnieje konieczność oczyszczania preparatów w celu uzyskania czystego kwasu.

Ze względu na wyżej wymienione niedoskonałości kwasu hialuronowego otrzymywanego z tkanek zwierzęcych, związek ten otrzymuje się również za pomocą metody bazującej na hodowli odpowiednich szczepów bakterii, przykładowo bakterii *Streptococcus*. Bakterie tego gatunku są w stanie przetwarzać glukozę oraz produkować kwas hialuronowy jako drugorzędowy metabolit, który wykorzystują do budowania otoczek ochronnych. Kwas hialuronowy pochodzenia mikrobiologicznego charakteryzuje się wyższą czystością oraz niższym kosztem produkcji w porównaniu do kwasu hialuronowego pochodzenia zwierzęcego.

Z literatury patentowej znane są rozwiązania dotyczące otrzymywania kwasu hialuronowego z tkanek zwierzęcych oraz mikroorganizmów.

Z amerykańskiego dokumentu patentowego US4141973 znany jest sposób izolowania kwasu hialuronowego o wysokiej masie cząsteczkowej z tkanek zwierzęcych o jego wysokiej zawartości. Otrzymywanie kwasu hialuronowego według powyższego wynalazku odbywa się w procesie zawierającym etapy: usuwania krwi z tkanki zwierzęcej, ekstrakcji kwasu hialuronowego, deproteinizacji ekstraktu kwasu hialuronowego, usuwanie jakichkolwiek czynników wywołujących zapalenie poprzez obróbkę

ekstraktu kwasu hialuronowego o pH równym 7 chloroformem oraz oddzielenie fazy chloroformu od kwasu hialuronowego. Otrzymany w ten sposób czysty kwas hialuronowy nie zawiera mikroorganizmów, białek ani pirogenów, więc jego stosowanie nie wywołuje stanów zapalnych.

Z amerykańskiego dokumentu patentowego US4801539 znany jest sposób otrzymywania kwasu hialuronowego na drodze fermentacji mikrobiologicznej paciorkowców wyizolowanych przykładowo ze spojówki gałki ocznej świnki morskiej. Podłoże hodowlane według przykładowego sposobu wykonania składa się z glukozy, ekstraktu drożdżowego oraz przeciwspieniacza polietereowego. Sterylną pożywkę mikrobiologiczną szczepiono komórkami bakterii *Streptococcus zooepidemicus*, po czym hodowlę prowadzono przez okres dwóch dni. Po tym okresie usunięto białka z mieszaniny za pomocą roztworu chloroformu z alkoholem izoamylovym, a składniki o niskiej masie cząsteczkowej usunięto poprzez zastosowanie ultrafiltracji. Następnie kwas hialuronowy odzyskiwano za pomocą liofilizacji. Kwas hialuronowy otrzymany metodą według wynalazku jest wolny od zanieczyszczenia streptolizyną, co jest pożądane w przypadku stosowania do go kompozycji naskórných.

Z amerykańskiego dokumentu patentowego US4517295 znany jest sposób otrzymywania kwasu hialuronowego na drodze procesu zawierającego etapy: fermentacji mikrobiologicznej paciorkowców, następnie oddzielania bakterii od bulionu oraz izolowania kwasu hialuronowego od pozostałych zawartości bulionu. Fermentację, według powyższego wynalazku przeprowadza się w warunkach beztlenowych, w środowisku wzbogaconym o dwutlenek węgla. Zastosowanie rozwiązania według wynalazku pozwala na uzyskanie kwasu hialuronowego o wysokiej czystości, z wysoką wydajnością.

Z amerykańskiego dokumentu patentowego US4897349 znany jest sposób biosyntezy kwasu hialuronowego oparty na fermentacji z wykorzystaniem bakterii *S. zooepidemicus*, *S. equisimilis* lub *S. pyogenes*. Dzięki zastosowaniu podłoża hodowlanego zawierającego takie składniki odżywcze jak węglowodany, aminokwasy, witaminy, sole nieorganiczne oraz substancje dodatkowe ze względu na bardzo złożone wymagania żywieniowe paciorkowców, oraz przy kontroli stężenia dwutlenku węgla podczas fermentacji, uzyskano ogólną poprawę wydajności otrzymywanego kwasu hialuronowego.

Mimo istniejących rozwiązań w dziedzinie otrzymywania kwasu hialuronowego ze źródeł biologicznych, nadal istnieje potrzeba udoskonalenia tych technologii w celu obniżenia kosztów produkcji oraz ograniczenia stosowania wybuchowych rozpuszczalników organicznych.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu hialuronowego z wykorzystaniem hodowli kultur bakterii zdolnych do produkcji kwasu hialuronowego, obejmujący kolejne etapy: przygotowania inokulum, zaszczepienia fermentora i hodowli bakterii oraz czynności pofermentacyjnych (ang. downstream) charakteryzujący się tym, że: podłoże hodowlane poddaje się zaszczepieniu kulturą bakterii zdolną do produkcji kwasu hialuronowego, następnie zaszczepione podłoże hodowlane namnaża się na wyrząsarce przy obrotach w zakresie od 100 do 250 obr./min, w temperaturze od 30 do 37°C w czasie od 10 do 24 godz.; następnie fermentor wypełnia się podłożem hodowlanym, po czym podłoże hodowlane szczepi się inokulum w objętości od 5 do 20% obj. fermentora, a następnie prowadzi się hodowlę w temp. od 30 do 37°C, przy stężeniu tlenu od 10 do 40%, w czasie od 12 do 24 godz.; a następnie zawieszinę poddaje się wirowaniu na wirówce ciągłej przy obrotach od 10000 do 15000 obr./min, po czym komórki bakteryjne zawieszają się w wodzie dejonizowanej z dodatkiem od 0,05 do 0,5% wag. detergentów przy zastosowaniu ultradźwięków w czasie od 0,5 do 2 godz., po czym ponownie wiruje się, a uzyskany supernatant filtruje się na membranach do filtracji stycznej o wielkości porów w zakresie od 2 do 10 kDa, po czym filtrat schładza się do temperatury od 4 do 10°C, a następnie dodaje się rozpuszczalnik organiczny o temperaturze od -20 do -10°C w objętości od 100 do 300% obj. w stosunku do filtratu, po czym mieszaninę filtratu i rozpuszczalnika organicznego pozostawia się w temperaturze od -20 do -10°C na czas od 12 do 24 godz., a następnie zawieszinę kwasu hialuronowego odwirowuje się przy obrotach od 5000 do 10000 obr./min, po czym otrzymany osad kwasu hialuronowego rozpuszcza się w wodzie (123) o temperaturze od 40 do 70°C oraz filtruje, a następnie filtrat schładza się do temperatury od 4 do 10°C oraz dodaje się rozpuszczalnik organiczny o temperaturze od -20 do -10°C w objętości od 100 do 300% obj. w stosunku do filtratu, a następnie mieszaninę filtratu i rozpuszczalnika organicznego wytrąca się w temperaturze od -20 do -10°C w czasie od 12 do 24 godz., po czym osad kwasu hialuronowego suszy się w temperaturze od 20 do 40°C pod ciśnieniem od 5 do 300 mbar.

Korzystnie, stosuje się podłoże hodowlane, które zawiera: glukozę w ilości od 2 do 15% wag., glicerol w ilości od 0,1 do 10% wag., siarczan (VI) magnezu (II) w ilości od 0,05 do 0,1% wag., fosforan (V) potasu w ilości od 0,05 do 0,2% wag., namok kukurydziany w ilości od 1 do 5% wag. i ekstrakt drożdżowy w ilości od 2 do 10% wag., pepton kazeinowy w ilości od 1 do 5% wag. i pepton sojowy w ilości od 1 do 5% wag.

Korzystnie, jako kultury bakterii do produkcji kwasu hialuronowego stosuje się szczepy bakterii rodzaju *Streptococcus*.

Korzystnie, jako rozpuszczalnik organicznym do wytrącania kwasu hialuronowego stosuje się etanol, metanol, aceton lub izopropanol.

Przedmiot wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia schemat blokowy procesu wytwarzania kwasu hialuronowego z wykorzystaniem hodowli kultur bakterii.

Na Fig. 1 przedstawiono schematycznie sposób wytwarzania kwasu hialuronowego. Sposób obejmuje trzy etapy: przygotowanie inokulum (I), zaszczepienie fermentora i hodowli (II) oraz czynności pofermentacyjne, zwane z języka angielskiego etapem „downstream” (III). Na etapy składają się operacje jednostkowe: Zaszczepiania 103, 108, namnażania 104, hodowli 109, wirowania 110, 121, zawieszania 111, filtracji 116, schładzania 118, rozpuszczania 124, wytrącania 129 oraz suszenia 131 poszczególnych substratów i produktów pośrednich: podłoża hodowlanego 101, 107, inokulum 106, wody i detergentów 112, osadu bakteryjnego 114, osadu 117, 126, rozpuszczalnika organicznego 119, 128 oraz wody 123 a także z wykorzystaniem fermentora 106 do uzyskania kwasu hialuronowego 132.

Kwas hialuronowy (132) według powyższego wynalazku wytwarza się w procesie składającym się z trzech etapów: przygotowania inokulum (I), zaszczepienia fermentora i hodowli (II) oraz tzw. „downstream” (III).

Na etapie przygotowania inokulum (I), podłoże hodowlane (101) zawierające w zależności od użytych kultur bakterii: źródło węgla w postaci glukozy w ilości od 2 do 15% wag. i glicerolu w ilości od 2 do 10% wag., sole przykładowo siarczan (VI) magnezu (II) w ilości od 0,2 do 2% wag., oraz forforan (V) potasu w ilości od 0,1 do 1% wag., źródło azotu w postaci namoku kukurydzianego w ilości od 1 do 10% wag. i ekstraktu drożdżowego w ilości od 1 do 10% wag., oraz źródło białka w postaci peptonu kazeinowego w ilości od 1 do 5% wag. i peptonu sojowego w ilości od 1 do 5% wag. poddaje się zaszczepieniu (103) kulturą bakterii rodzaju *Streptococcus* lub zmodyfikowanym genetycznie szczepem bakterii rodzaju *Bacillus* (102) zdolną do produkcji kwasu hialuronowego. Następnie, zaszczepione podłoże hodowlane namnaża się (104) na wytrząsarce przy obrotach w zakresie od 100 do 250 obr./min, w temperaturze od 30 do 37°C w czasie od 10 do 24 godz., do osiągnięcia gęstości optycznej podłoża hodowlanego OD 620 w zakresie od 0,6 do 1,2. W kolejnym etapie, zaszczepienia fermentora i hodowli (II), fermentor (106) wypełnia się podłożem hodowlanym (107) zawierającym w zależności od użytych kultur bakterii źródło węgla w postaci glukozy w ilości od 2 do 15% wag. i glicerolu w ilości od 2 do 10% wag., sole przykładowo siarczan (VI) magnezu (II) w ilości od 0,2 do 2% wag. oraz fosforan (V) potasu w ilości od 0,1 do 1% wag., źródło azotu w postaci namoku kukurydzianego w ilości od 1 do 10% wag. i ekstraktu drożdżowego w ilości od 1 do 10% wag., oraz źródło białka w postaci peptonu kazeinowego w ilości od 1 do 5% wag. i peptonu sojowego w ilości od 1 do 5% wag. oraz szczepi się (108) inokulum (105) w objętości od 5 do 20% obj. fermentora (106). Następnie, prowadzi się hodowlę (109) w temp. Od 30 do 37°C, przy stężeniu tlenu od 10 do 40%, w czasie od 12 do 24 godz., do osiągnięcia wartości gęstości optycznej OD620 w zakresie od 12 do 35.

Po zakończonej hodowli (109) w ostatnim etapie procesu, tzw. „downstream” (III) zawiesinę poddaje się wirowaniu (110) na wirówce ciągłej przy obrotach od 10000 do 15000 obr./min. Następnie, komórki bakteryjne zawieszają się (111) w wodzie dejonizowanej z dodatkiem od 0,05 do 0,5% wag. detergentów (112), przykładowo SDS, Triton X100, cholan sodu, Brij 35 przy zastosowaniu ultradźwięków w czasie od 0,5 do 2 godz., po czym ponownie wiruje się (113), w wyniku którego uzyskuje się dwie frakcje: osad bakteryjny (114) oraz supernatant (115) wykorzystywany do dalszej obróbki. Następnie supernatant (115) filtruje się (116) na membranach do filtracji stycznej (ang. TFF – Tangential Flow Filtration) o wielkości porów w zakresie od 2 do 10 kDa w celu usunięcia małych cząstek osadu (117), a filtrat schładza się (118) do temperatury od 4 do 10°C, po czym dodaje się rozpuszczalnik organiczny (119), przykładowo etanol, metanol, aceton czy izopropanol o temperaturze od -20 do -10°C w objętości od 100 do 300% obj. w stosunku do filtratu. Mieszaninę filtratu i rozpuszczalnika organicznego pozostawia się w temperaturze od -20 do -10°C na czas od 12 do 24 godz. Następnie, zawiesinę kwasu hialuronowego odwirowuje się (121) przy obrotach od 5000 do 10000 obr./min, po czym otrzymany osad kwasu hialuronowego (122) rozpuszcza się w wodzie (123) o temperaturze od 40 do 70°C.

Nierozpuszczony w wodzie osad (126) oddziela się poprzez filtrację (125), a następnie filtrat (127) schładza się do temperatury od 4 do 10°C oraz dodaje się rozpuszczalnik organiczny (128), przykładowo etanol, metanol, aceton czy izopropanol o temperaturze od -20 do -10°C w objętości od 100 do 300% obj. w stosunku do filtratu. Mieszaninę filtratu (127) i rozpuszczalnika organicznego (128) wytrąca się

(129) w temperaturze od -20 do -10°C w czasie od 12 do 24 godz. Następnie, powstały w ten sposób osad kwasu hialuronowego (130) suszy się (131) w temperaturze od 20 do 40°C pod ciśnieniem od 5 do 300 mbar do uzyskania stałej suchej masy, w wyniku czego uzyskuje się produkt finalny jakim jest oczyszczony kwas hialuronowy(132).

Powyższy sposób otrzymywania kwasu hialuronowego charakteryzuje się obniżeniem kosztów otrzymania poprzez zastosowanie glicerolu jako źródła węgla w pożywce oraz znaczną redukcją wykorzystywania niebezpiecznych rozpuszczalników wybuchowych, podczas etapu „downstream”, a co za tym idzie wysoką efektywnością. Preparaty na bazie kwasu hialuronowego otrzymanego sposobem według powyższego wynalazku charakteryzują się wysoką biokompatybilnością oraz bezpieczeństwem stosowania poprzez ograniczenie możliwości wystąpienia immunogeniczności i reakcji nadwrażliwości, co może mieć miejsce w przypadku preparatów zawierających kwas hialuronowy pochodzenia zwierzęcego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasu hialuronowego z wykorzystaniem hodowli kultur bakterii zdolnych do produkcji kwasu hialuronowego, obejmujący kolejne etapy: przygotowania inokulum, zaszczepienia fermentora i hodowli bakterii oraz czynności pofermentacyjnych (ang. downstream) **znamienny tym**, że:
 - podłoże hodowlane poddaje się zaszczepieniu kulturą bakterii zdolną do produkcji kwasu hialuronowego, następnie zaszczepione podłoże hodowlane namnaża się na wytrząsarce przy obrotach w zakresie od 100 do 250 obr./min, w temperaturze od 30 do 37°C w czasie od 10 do 24 godz.;
 - następnie fermentor wypełnia się podłożem hodowlanym, po czym podłoże hodowlane szczepi się inokulum w objętości od 5 do 20% obj. fermentora, a następnie prowadzi się hodowlę w temp. od 30 do 37°C , przy stężeniu tlenu od 10 do 40%, w czasie od 12 do 24 godz.;
 - a następnie zawiesinę poddaje się wirowaniu na wirówce ciągłej przy obrotach od 10000 do 15000 obr./min, po czym komórki bakteryjne zawieszają się w wodzie dejonizowanej z dodatkiem od 0,05 do 0,5% wag. detergentów przy zastosowaniu ultradźwięków w czasie od 0,5 do 2 godz., po czym ponownie wiruje się, a uzyskany supernatant filtruje się na membranach do filtracji stycznej o wielkości porów w zakresie od 2 do 10 kDa, po czym filtrat schładza się do temperatury od 4 do 10°C , a następnie dodaje się rozpuszczalnik organiczny o temperaturze od -20 do -10°C w objętości od 100 do 300% obj. w stosunku do filtratu, po czym mieszaninę filtratu i rozpuszczalnika organicznego pozostawia się w temperaturze od -20 do -10°C na czas od 12 do 24 godz., a następnie zawiesinę kwasu hialuronowego odwirowuje się przy obrotach od 5000 do 10000 obr./min, po czym otrzymany osad kwasu hialuronowego rozpuszcza się w wodzie (123) o temperaturze od 40 do 70°C oraz filtruje, a następnie filtrat schładza się do temperatury od 4 do 10°C oraz dodaje się rozpuszczalnik organiczny o temperaturze od -20 do -10°C w objętości od 100 do 300%obj. w stosunku do filtratu, a następnie mieszaninę filtratu i rozpuszczalnika organicznego wytrąca się w temperaturze od -20 do -10°C w czasie od 12 do 24 godz., po czym osad kwasu hialuronowego suszy się w temperaturze od 20 do 40°C pod ciśnieniem od 5 do 300 mbar.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się podłoże hodowlane, które zawiera: glukozę w ilości od 2 do 15% wag., glicerol w ilości od 0,1 do 10% wag., siarczan (VI) magnezu (II) w ilości od 0,05 do 0,1% wag., fosforan (V) potasu w ilości od 0,05 do 0,2% wag., namok kukurydziany w ilości od 1 do 5% wag. i ekstrakt drożdżowy w ilości od 2 do 10% wag., pepton kazeinowy w ilości od 1 do 5% wag i pepton sojowy w ilości od 1 do 5% wag.
3. Sposób wytwarzania kwasu hialuronowego według dowolnego z zastrz. 1–2, **znamienny tym**, że jako kultury bakterii do produkcji kwasu hialuronowego stosuje się szczepy bakterii rodzaju *Streptococcus*.
4. Sposób wytwarzania kwasu hialuronowego według dowolnego z zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik organiczny do wytrącania kwasu hialuronowego jest etanol, metanol, aceton lub izopropanol.

Rysunek

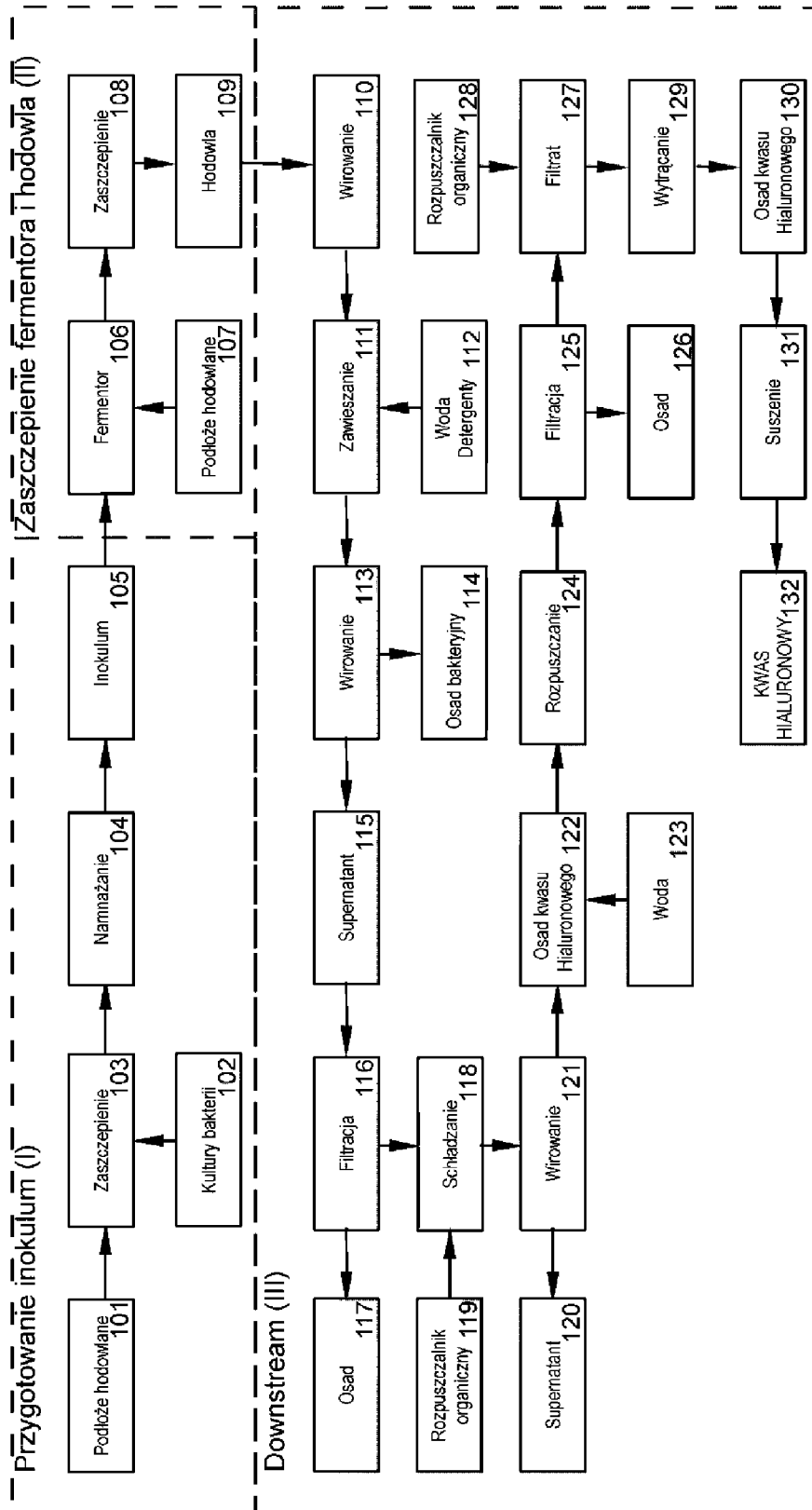


Fig. 1