

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 635 533**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **89 04370**

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 P 19/34.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 3 avril 1989.

③0 Priorité : SU. 14 juin 1988, n° 4432648.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 8 du 23 février 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT MORFOLOGII CHELOVEKA
AKADEMII MEDITSINSKIKH NAUK SSSR, MEZHOTRAS-
LEVOI NAUCHNO-TEKHNICHESKY KOMPLEX « MIKROK-
HIRURGIA GLAZA » et NAUCHNO-PROIZVODSTVENNOE
OBIEDINENIE « BIOLAR » AKADEMII NAUK SSSR. — SU.

⑦2 Inventeur(s) : Boris Borisovich Fux ; Marina Evgenievna
Shabanova ; Svyatoslav Nikolaevich Fedorov ; Jury Mik-
hailovich Krasnopolsky ; Uldis Yanovich Mixtais ; Evgeny
Dmitrievich Ermolaev ; Mara Augustovna Gailuma.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Lavoix.

⑤4 Procédé de fabrication du mélange de ribonucléotides.

⑤7 La présente invention se rapporte à l'industrie pharmaceu-
tique et concerne un procédé de préparation d'un mélange de
ribonucléotides consistant à hydrolyser l'acide ribonucléique de
levure au moyen de la ribonucléase pancréatique à un pH
compris entre 4,5 et 5,5, séparer à partir de l'hydrolysate
obtenu la fraction contenant les ribonucléotides sur une mem-
brane dont les pores ont un diamètre compris entre 5 et
15 nm, et extraire le produit désiré par l'éthanol.

Le mélange de ribonucléotides ainsi préparé trouve son
application en médecine dans le traitement des abiotrophies
tapétorétiniennes et autres maladies.

FR 2 635 533 - A1

D

La présente invention se rapporte à la médecine et, concerne, plus précisément, une préparation d'un mélange de ribonucléotides employé en thérapeutique comme médicament pour traiter les abiotrophies tapétorétiniennes et autres ma-
05 lades.

Les abiotrophies tapétorétiniennes forment un groupe de maladies héréditaires de l'homme qui altèrent la vue et conduisent à la cécité. Ces maladies sont assez répandues et concernent de 0,5 à 5 personnes sur 1000 habitants. Or, jus-
10 qu'à présent, il n'existe pas de moyens efficaces de traitement des abiotrophies tapétorétiniennes.

On connaît un procédé de fabrication d'un mélange de ribonucleotides doué de propriétés pharmacologiques ("Bulletin de biologie expérimentale et de médecine", 1969, Mos-
15 cou, N° 9, p. 23 à 26). Ce procédé consiste à traiter l'acide ribonucléique à une concentration comprise entre 5 et 10 mg/ml par la ribonucléase pancréatique à une température de 45°C pendant 1 heure.

Ce procédé a, cependant, un faible rendement en
20 produit désiré. Le mélange de ribonucléotides obtenu contient en outre des additifs, tels que protéines, substances pyrogéniques à haut poids moléculaire et ne peut donc être soumis qu'à une application locale sous forme de bandages externes. L'administration per os de la préparation indiquée peut, en
25 outre, entraîner une dégradation importante des nucléotides du médicament, ce qui compromet l'efficacité du traitement.

On connaît aussi un procédé de fabrication d'un mélange de ribonucléotides (Vestnik de l'Académie des Sciences médicales d'U.R.S.S., 1971, Méditsina, N° 7, p. 63 à 69). Le
30 procédé consiste à hydrolyser l'acide ribonucléique de levure par la ribonucléase pancréatique, puis à dialyser l'hydrolysate obtenu, et isoler et concentrer le produit désiré. Le rendement en produit désiré s'élève à 40 à 43 % en poids.

Ce procédé a un faible rendement en produit désiré,
35 une pureté insuffisante due à la présence de composés pyrogé-

niques à bas et à haut poids moléculaire. Lors d'injections intramusculaires de la préparation mentionnée, on note une forte douleur, une élévation de la température corporelle chez la plupart des malades, des réactions allergiques, tandis qu'en injections subconjonctivales, on observe une hyperémie et un oedème de la conjonctive bulbaire avec gonflement et douleur des ganglions lymphatiques optiques.

Le problème résolu par la présente invention consistait, par conséquent, à élaborer un procédé permettant d'augmenter le rendement en produit désiré, d'élever sa pureté et d'éliminer son action pyrogène.

Par conséquent, l'objet de l'invention consiste en un procédé de préparation d'un mélange de ribonucléotides consistant en une hydrolyse de l'acide ribonucléique de levure au moyen de la ribonucléase pancréatique, suivie de la séparation à partir de l'hydrolysate obtenu de la fraction contenant les ribonucléotides et de l'extraction à partir de celle-ci du produit désiré, caractérisé en ce que, l'hydrolyse de l'acide ribonucléotique de levure est réalisée à un pH compris entre 4,5 à 5,5, et que la séparation de la fraction contenant les ribonucléotides à partir de l'hydrolysate est effectuée sur des membranes dont les pores ont un diamètre compris entre 5 et 10 nm.

Afin d'augmenter le rendement en produit désiré, on préfère mener l'hydrolyse à une température comprise entre 62 et 65°C.

A une température inférieure à 62°C, l'hydrolyse enzymatique par la ribonucléase pancréatique, se déroule lentement, tandis qu'à une température supérieure à 65°C, l'enzyme est partiellement dénaturée et l'hydrolyse devient incomplète.

Afin d'éliminer la formation de flore microbienne, on ajoute de manière avantageuse dans l'hydrolysate, avant la séparation de la fraction contenant les ribonucléotides, de l'éthanol en une quantité comprise entre 15 et 30 % du volume de l'hydrolysate. Une quantité d'éthanol inférieure à 15 % en

volume ne freine pas la formation de la flore microbienne, alors qu'une quantité supérieure à 30 % en volume entraîne une précipitation partielle des ribonucléotides.

05 Il est avantageux d'effectuer la séparation de la fraction contenant les ribonucléotides sur des membranes à une température comprise entre 20 et 30°C et à une pression comprise entre 0,15 et 0,4 MPa. La filtration du mélange à une pression inférieure à 0,15 MPa et à une température inférieure à 20°C augmente notablement la durée du processus
10 sans élever le rendement de la préparation, tout en laissant subsister le risque de contamination par la flore microbienne. Une pression supérieure à 0,4 MPa et une température supérieure à 30°C peuvent conduire à une modification de la composition de la préparation en même temps qu'à la destruction des membranes.
15

Selon l'invention, la séparation du produit désiré s'effectue par précipitation de la fraction contenant les ribonucléotides par 8 à 10 volumes d'éthanol, par volume de la fraction contenant les nucléotides, élimination du solvant et séchage du produit désiré.
20

La séparation du produit désiré peut aussi être réalisée par précipitation du mélange contenant les ribonucléotides par 8 à 10 volumes d'éthanol, par volume de mélange, élimination du solvant, dissolution du résidu dans une solution
25 à 0,55 à 0,65 % de chlorure de sodium jusqu'à une concentration du mélange contenant les ribonucléotides comprise entre 3,3 et 3,7 % en poids, filtration de la solution ainsi obtenue sur des membranes dont les pores ont un diamètre de 200 à 220 nm sous une pression de 78 à 98 kPa.

30 La précipitation du mélange des ribonucléotides par un volume d'éthanol inférieur à 8 volumes, volume du mélange, ne permet pas d'éliminer entièrement les composés pyrogènes à bas poids moléculaire, tandis que la précipitation par un volume d'éthanol supérieur à 10 volumes n'apporte aucun effet positif.
35

Quand on obtient une préparation de ribonucléotides à une concentration supérieure à 3,7 % en poids, on note une pyrogénéité prononcée, tandis que l'utilisation de la préparation à une concentration inférieure à 3,3 % en poids impose une augmentation du volume de liquide injecté, ce qui est indésirable pour le malade.

Une filtration réitérée sur membranes, dont le diamètre des pores est inférieur à 200 nm, ralentit la vitesse du procédé, alors qu'une filtration sur une membrane dont le diamètre des pores est supérieur à 220 nm de diamètre, rend la préparation pyrogène et non conforme.

Le procédé selon l'invention permet d'augmenter de 8 à 15 % le rendement en produit désiré par rapport au procédé connu, d'élever sa pureté, et aussi de supprimer sa pyrogénéité.

Le procédé selon l'invention est décrit plus en détail, ci-après.

L'acide ribonucléique de levure est mis en suspension dans de l'eau distillée, le pH de la solution est ajusté au moyen d'une solution alcaline jusqu'à un pH de 4,5 à 5,5. A cette solution, on ajoute la ribonucléase pancréatique, on chauffe la solution jusqu'à une température de 62 à 65°C, et on maintient la solution à cette température de manière à réaliser l'hydrolyse de l'acide ribonucléique. L'hydrolyse étant terminée, on refroidit l'hydrolysate, on ajoute de l'éthanol et on agite. Pour séparer le précipitat finement dispersé, formé après l'addition de l'éthanol, le mélange est soumis à une microfiltration. La solution filtrée est ensuite fractionnée par ultrafiltration à travers des membranes ayant des pores de 5 à 15 nm de diamètre, de préférence à une température de 20 à 30°C et à une pression de 0,15 à 0,4 MPa. Après la séparation du filtrat, le concentrat est dilué à l'eau distillée et on obtient une quantité supplémentaire de filtrat. On ajoute à la quantité totale de l'ultrafiltrat, sous agitation, l'éthanol. Après défécation du mélange, le

liquide surnageant est décanté, le dépôt de produit désiré est lavé avec une petite quantité d'éthanol, on filtre ensuite l'éthanol et le dépôt est séché.

05 Le produit désiré peut aussi bien être obtenu sec qu'en solution. Dans ce cas, le mélange des ribonucléotides, séparé après précipitation par 8 à 10 volumes d'éthanol, est dissous dans une solution à 0,55 à 0,65 % de chlorure de sodium jusqu'à atteindre une concentration de 3,3 à 3,7 % en poids. La solution obtenue est filtrée sur une membrane dont
10 les pores ont un diamètre de 200 à 220 nm, sous une pression de 78 à 98 kPa.

Le produit désiré est obtenu sous forme d'une poudre amorphe blanche ou légèrement jaunâtre, bien soluble dans l'eau, dans les solutions aqueuses de chlorure de sodium, se
15 dissolvant moins bien dans l'éthanol, et insoluble dans l'acétone et l'éther. La préparation comprend un complexe de mono-oligoribonucléotides (jusqu'aux hectomères inclusivement) dont la principale partie (jusqu'à 40 % en poids) est composée de dinucléotides.

20 Le mélange de ribonucléotides, obtenu d'après le procédé selon l'invention, a été expérimenté en clinique sous contrôle strict des résultats du traitement qui comportaient l'étude du champ visuel, les électrorétinogrammes; l'adaptation à l'obscurité et l'acuité de la vue. Les essais ont été
25 réalisés sur un total de 2500 patients. La durée du traitement était de 10 à 15 jours. La préparation était administrée par injections intramusculaires de 150 à 200 mg par jour en 2 fois à un intervalle de 4 à 6 heures.

30 Sur 2500 patients, 467 faisaient l'objet d'un traitement de longue durée (de 4 à 14 ans et plus).

L'analyse des résultats obtenus lors d'une observation prolongée montre que chez 60 % des malades, on note une stabilisation ou une stabilisation avec amélioration du cours de cette maladie grave évolutive. On observe, en outre, une
35 meilleure aptitude des patients à s'orienter lors de déplacement.

ments aussi bien dans un local fermé qu'en plein air.

Les exemples non limitatifs suivants donnent une meilleure illustration du procédé selon l'invention.

05

EXEMPLE 1

10

15

20

25

On dissout 70 g d'acide ribonucléique de levure, dans 430 ml d'eau distillée, et on porte le pH de la solution jusqu'à 5,1 avec NaOH 2N. On ajoute 140 mg de ribonucléase pancréatique et on laisse l'hydrolyse s'effectuer durant 5 heures à la température de 65°C. Le volume total d'hydrolysate est de 465 ml. On refroidit ensuite jusqu'à une température de 25 à 35°C, on ajoute 120 ml d'éthanol, on filtre le dépôt finement dispersé formé et le filtrat est soumis à une ultrafiltration sur membrane d'acétylcélulose ayant des pores de 10 nm de diamètre (membrane à surface utile de 100 cm²), sous une pression de 0,4 MPa et à une température de 30°C. On obtient 360 ml de filtrat. A la masse restante, on ajoute à deux reprises par 70 ml d'eau et on obtient en supplément 140 ml de filtrat. Le filtrat (500 ml) est mélangé à 5 l d'alcool éthylique (10 volumes d'éthanol 1 volume de filtrat). La suspension obtenue est refroidie jusqu'à 0 à 4°C, et maintenue à cette température durant 4 heures. Le résidu est séparé par filtration, lavé avec 0,360 l d'alcool éthylique et mis à sécher sous vide. Le rendement en produit désiré est de 36 g.

L'extinction spécifique $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 240$ pour $\lambda = 260\text{ nm}$ et pH = 2. Les rapports des absorptions lumineuses (A) à pH 7 et aux longueurs d'ondes 230 nm, 260 nm, 280 nm sont respectivement :

30

A 260/230 3,15

A 260/280 1,60

Composition du produit désiré obtenu, % en poids :

nucléosides 1,5

35

mononucléotides 25,6

	dinucléotides	28,1
	trinucléotides	23,8
	tétranucléotides	12,8
	pentanucléotides et	
05	oligonucléotides supérieurs	le complément à 100.

EXEMPLE 2

On dissout 67 g d'acide ribonucléique de levure, dans 400 ml d'eau distillée, et on porte le pH de la solution jusqu'à 4,5 avec NaOH 2N. On ajoute 130 mg de ribonucléase pancréatique et on laisse l'hydrolyse s'effectuer durant 5 heures à la température de 62°C. Le volume total de l'hydrolysate est de 430 ml. Après refroidissement jusqu'à une température de 25 à 35°C, on ajoute à l'hydrolysate 15 64,5 ml d'éthanol et on filtre. On fractionne par ultrafiltration sur membrane d'acétylcellulose dont les pores ont 15 nm de diamètre (membrane à surface utile de 100 cm²) à une température de 20°C et sous une pression de 0,3 MPa. On obtient 380 ml de filtrat en 6 heures. On ajoute à la masse 20 restante 65 ml d'eau, ce qui permet d'obtenir un supplément de 65 ml de filtrat. Le filtrat, ayant un volume total de 445 ml, est mélangé avec 3,6 l d'alcool éthylique. Le dépôt qui se forme ainsi est filtré, lavé avec 0,3 l d'éthanol et séché dans une étuve sous vide.

25 Le rendement en produit désiré est de 39 g.

L'extinction spécifique $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 240$ pour $\lambda = 260\text{ nm}$ et pH = 2.

Rapports des absorptions lumineuses à pH 7 et aux longueurs d'ondes de 230 nm, 260 nm et 280 nm :

30	A 260/230	3,90
	A 260/280	1,70
	Composition du produit désiré, % en poids :	
	nucléosides	4,8
35	mononucléotides	19,3

	dinucléotides	23,1
	trinucléotides	20,2
	tétranucléotides	16,9
	pentanucléotides et	
05	oligonucléotides supérieurs	le complément à 100

EXEMPLE 3

On dissout 77 g d'acide ribonucléique de levure, dans 460 ml d'eau distillée, et on porte le pH de la solution jusqu'à 5,5 avec NaOH 2N. On ajoute 150 mg de ribonucléase pancréatique et laisse l'hydrolyse s'effectuer durant 5 heures à la température de 65°C. Le volume total de l'hydrolysate est de 500 ml. On refroidit ensuite jusqu'à une température de 25 à 35°C, on ajoute 150 ml d'éthanol. Le dépôt finement dispersé qui se forme est alors filtré. Le filtrat est soumis à une ultrafiltration sur membrane d'acétylcellulose dont les pores ont 5 nm de diamètre (membrane à surface utile de 100 cm²) sous une pression de 0,2 MPa et à une température de 25°C pendant 4 heures. Le filtrat (560 ml) est mélangé à 4,5 l d'alcool éthylique (8 volumes d'éthanol 1 volume de filtrat), la suspension obtenue est refroidie jusqu'à 0 à 4°C, et maintenue à cette température durant 4 heures. Le dépôt précipité est séparé par filtration, lavé avec 0,4 l d'alcool éthylique et séché à l'étuve sous vide.

Le rendement en produit désiré est de 40 g.

L'extinction spécifique $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 228$ à $\lambda = 260\text{ nm}$ et pH 2.

Rapports d'absorptions lumineuses à pH 7 et aux longueurs d'ondes de 230 nm, 260 nm et 280 nm :

	A 260/230	4
	A 260/280	1,55
	Composition du produit désiré, % en poids :	
35	nucléosides	2,1

	mononucléotides	12,6
	dinucléotides	25,2
	trinucléotides	24,2
	tétranucléotides	18,5
05	pentanucléotides et	
	oligonucléotides supérieurs	le complément à 100.

EXEMPLE 4

10 L'hydrolyse de l'acide ribonucléique de levure et la séparation de la fraction contenant les ribonucléotides sont effectuées de manière analogue à celle décrite dans l'Exemple 1. Le dépôt isolé (36 g de mélange sec) est dis-

15 sout dans une solution de chlorure de sodium à 6 %, dans de l'eau distillée (958 ml), et on agite jusqu'à dissolution complète. La solution jaune obtenue est filtrée sur filtre à l'ouate et en gaze, puis sur une membrane ayant des pores de 200 nm de diamètre sous une pression de 98 kPa. Dans des conditions stériles, la solution de ribonucléotides est mise

20 dans des ampoules de verre neutre de 3 ml qui sont ensuite autoclavées à la température de 119°C durant 34 minutes. La concentration des ribonucléotides dans le produit désiré est de 3,3 %, la densité, de 1,01 g/cm³. On obtient un produit non toxique, stérile, apyrogène, dont la composition est analogue à celle décrite dans l'Exemple 1.

25

EXEMPLE 5

30 L'hydrolyse de l'acide ribonucléique de levure et la séparation de la fraction contenant les ribonucléotides sont menées de manière analogue à celle de l'Exemple 2. Le dépôt, après séparation, (39 g de mélange sec) est dissous dans une solution de chlorure de sodium à 0,55 % (995 ml) dans de l'eau distillée et on mélange jusqu'à la dissolution complète. La solution jaune obtenue est filtrée sur filtre à l'ouate et en gaze, puis sur membrane dont les pores ont

35 220 nm de diamètre sous une pression de 78 kPa. Dans des

conditions stériles, la solution des ribonucléotides est mise dans des ampoules de verre neutre de 3 ml qui sont ensuite autoclavées à 122°C durant 32 minutes. La concentration des ribonucléotides dans le produit désiré est de 3,7 %, la densité, de 1,008 g/cm³. Le produit obtenu est non toxique, stérile. Son application ne provoque pas d'effet pyrogène. Sa composition est identique à celle de l'Exemple 2.

05

REVENDEICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un mélange de ribonucléotides consistant en une hydrolyse de l'acide ribonucléique de levure au moyen de la ribonucléase pancréatique, suivie de la
05 séparation à partir de l'hydrolysate obtenu de la fraction contenant les ribonucléotides et de l'extraction à partir de celle-ci du produit désiré, caractérisé en ce que l'hydrolyse de l'acide ribonucléique de levure est réalisée à un pH compris entre 4,5 et 5,5, et que la séparation de la fraction conte-
10 nant les ribonucléotides à partir de l'hydrolysate est effectuée sur des membranes dont les pores ont un diamètre compris entre 5 et 15 nm.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hydrolyse est réalisée à une température comprise
15 entre 62 et 65°C.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'avant la séparation de la fraction contenant les ribonucléotides, on ajoute dans l'hydrolysate une
20 quantité d'éthanol comprise entre 15 et 30 % par rapport au volume de l'hydrolysate.

4. Procédé d'après l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séparation de la fraction des ribonucléotides sur membranes est réalisée à une température comprise entre 20 et 30°C sous pression comprise entre 0,15 et 0,4
25 MPa.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'extraction du produit désiré est réalisée par précipitation de la fraction contenant les ribonucléotides par 8 à 10 volumes d'éthanol par volume de la fraction
30 contenant les ribonucléotides, élimination du solvant et séchage du produit désiré.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séparation du produit désiré est effectuée par précipitation de la fraction contenant les ribonucléotides avec 8 à 10 volumes d'éthanol par volume de la
35

fraction contenant les ribonucléotides, élimination du solvant, dissolution dans une solution de chlorure de sodium à 0,55 à 0,65 %, jusqu'à l'obtention d'une solution ayant une concentration comprise entre 3,3 et 3,7 % en poids, filtration de la solution obtenue sur membranes dont les pores ont 200 à 220 nm de diamètre sous une pression comprise entre 78 et 98 kPa.

05