



CH 692 919 A5

19



CONFÉDÉRATION SUISSE  
INSTITUT FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

11 CH 692 919 A5

51 Int. Cl.<sup>7</sup>: C 12 P 019/26

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein  
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

12 FASCICULE DU BREVET A5



21 Numéro de la demande: 00154/99

22 Date de dépôt: 28.01.1999

24 Brevet délivré le: 13.12.2002

45 Fascicule du brevet  
publiée le: 13.12.2002

73 Titulaire(s):  
TRB CHEMEDICA S.A.,  
3, Chemin St-Marc, 1896 Vouvry (CH)

72 Inventeur(s):  
Dr. Stefano Carlino, Avenue de l'Europe 38a,  
1870 Monthey (CH)  
François Magnette, La Croix,  
1633 Marsens (CH)

74 Mandataire:  
William Blanc & Cie,  
conseils en propriété industrielle S.A.,  
9, rue du Valais, 1202 Genève (CH)

54 Procédé de purification de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé.

57 On décrit un procédé de purification de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique, notamment d'une source microbienne. Ce procédé comprend les étapes consistant à ajuster le pH d'une solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique à un pH se situant dans la gamme de 2,0 à 3,5 et ensuite à soumettre à une diafiltration la solution au même pH en utilisant un filtre ayant une taille des pores se situant dans la gamme allant d'un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 100 000 Daltons jusqu'à 0,45 µm, suivies par une étape de centrifugation et ensuite une étape de stérilisation. Ce procédé permet d'obtenir de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé de qualité pharmaceutique ou un sel de celui-ci.



CH 692 919 A5

## Description

La présente invention concerne un procédé de purification de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique afin d'obtenir de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé de qualité pharmaceutique ou un sel de celui-ci.

L'acide hyaluronique est un mucopolysaccharide d'origine biologique qui est largement répandu dans la nature. On sait par exemple que l'acide hyaluronique est présent dans divers tissus animaux comme les cordons ombilicaux, le liquide synovial, l'humour vitré, les crêtes de coq et divers tissus conjonctifs comme la peau et le cartilage.

Chimiquement, l'acide hyaluronique est un membre des glycoaminoglycannes et il est constitué par des motifs alternés et répétés d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine pour former une chaîne linéaire ayant un poids moléculaire pouvant aller jusqu'à  $13 \times 10^6$  Daltons.

Au sens de la présente invention, de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé est de l'acide hyaluronique ayant un poids moléculaire qui n'est pas inférieur à  $1 \times 10^6$  Daltons.

Il doit être noté que dans la présente description et les présentes revendications, le terme «acide hyaluronique» signifie indifféremment l'acide hyaluronique sous sa forme acide ou sous sa forme sel comme par exemple le hyaluronate de sodium, le hyaluronate de potassium, le hyaluronate de magnésium, le hyaluronate de calcium, ou autres.

Lorsqu'il a un poids moléculaire élevé, l'acide hyaluronique est visqueux et il est capable de maintenir un état gélifié, agissant comme lubrifiant pour éviter l'invasion de bactéries et pour retenir l'eau.

Grâce à ces propriétés, l'acide hyaluronique est capable de conserver la tonicité et l'élasticité de la peau.

L'utilisation pharmaceutique de l'acide hyaluronique ou d'un sel de celui-ci est largement décrite dans la littérature.

Puisque l'acide hyaluronique est une substance non-immunogène et qu'il a des propriétés hydrophiles et viscoélastiques, il est utilisé depuis plusieurs années comme agent de remplacement du fluide vitreux de l'œil ou du fluide articulaire ou comme milieu de soutien en chirurgie ophtalmique, comme décrit par exemple dans US-A-4 141 973 de Balazs.

Dans les liquides articulaires, la solution d'acide hyaluronique visqueuse sert de lubrifiant pour fournir un environnement protecteur aux cellules, et pour cette raison, il est utilisé dans le traitement des inflammations des articulations du genou.

EP-A-0 781 547 de Chemedica S.A. décrit une formulation ophtalmique à base de hyaluronate de sodium pour son utilisation en chirurgie oculaire.

EP-A-0 719 559 de Chemedica S.A. décrit des solutions visqueuses de hyaluronate de sodium pour leurs utilisations comme fluide masquant dans des photokératectomies thérapeutiques au moyen d'un laser excimère.

EP-A-0 875 248 de Chemedica S.A. décrit l'utili-

sation d'acide hyaluronique ou de l'un de ses sels pharmaceutiquement acceptables pour la préparation d'une solution aqueuse utile comme liquide de lavage intra-articulaire.

5 EP-A-0 698 388 de Chemedica S.A. décrit une préparation ophtalmique pour utilisation comme larmes artificielles contenant du hyaluronate comme agent augmentant la viscosité.

10 Grâce à sa nature fortement hydrophile, l'acide hyaluronique peut aussi être utilisé dans des produits cosmétiques comme des lotions et des crèmes.

L'utilisation pharmaceutique de l'acide hyaluronique ou d'un sel de celui-ci nécessite un produit très pur.

15 L'acide hyaluronique peut être extrait et purifié par exemple à partir de cordons ombilicaux, de crêtes de coqs ou de Streptocoques des groupes A et C comme décrit par exemple dans US-A-4 141 973 de Balazs et dans US-A-5 559 104 de Romeo et al.

20 La production d'acide hyaluronique par des Streptocoques a été décrite en premier par Forrest et al. en 1937 (J. Biol. Chem. 118, 61 (1937) et plus tard, il a été démontré que l'acide hyaluronique provenant d'une source animale est identique à l'acide hyaluronique provenant d'une source micro-

25 bienne. Les procédés pour préparer l'acide hyaluronique à partir d'une source microbienne sont basés sur la propriété qu'ont les Streptocoques d'avoir de l'acide hyaluronique comme constituant principal de leurs capsules.

30 De tels microorganismes sont capables de transformer le glucose présent dans leur environnement en acide D-glucuronique et en N-acétyl-D-glucosamine et de produire de l'acide hyaluronique comme métabolite secondaire, pour construire leurs capsules protectrices.

35 La biosynthèse de l'acide hyaluronique par des Streptocoques est décrite par exemple dans US-A-4 897 349 de Swann et al.

40 On connaît un certain nombre de procédés pour obtenir de l'acide hyaluronique de qualité pharmaceutique ou un sel de celui-ci à partir de sources microbiennes.

45 Par exemple, US-A-4 780 414 de Nimrod et al., US-A-4 517 295 de Bracke et al., et US-A-5 563 051 de Ellwood et al. décrivent des procédés pour obtenir de l'acide hyaluronique par fermentation continue de bactéries de type Streptocoque et ensuite purification de l'acide hyaluronique ainsi obtenu jusqu'à une qualité pharmaceutique.

50 Cependant, dans tous ces procédés, la purification de l'acide hyaluronique implique la précipitation de l'acide hyaluronique provenant d'une source microbienne en utilisant de grandes quantités de solvants organiques comme l'éthanol, l'acétone, l'isopropanol, etc.

55 On connaît quelques procédés de purification dans lesquels la précipitation de l'acide hyaluronique provenant d'une source microbienne s'effectue avec des sels d'ammonium quaternaires (US-A-4 517 295 de Bracke et al.) ou avec des agents tensioactifs anioniques et cationiques (US-A-5 316 926 de Brown et al.).

Cependant, les procédures décrites sont assez complexes et ont maintenu jusqu'ici le coût de production du produit à un niveau élevé.

On connaît quelques procédés de purification dans lesquels une solution d'acide hyaluronique est diafiltrée en utilisant un filtre ayant un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 10 000, 20 000 or 30 000 Daltons comme décrit par exemple dans US-A-5 563 051 de Ellwood et al. et dans US-A-4 517 295 de Bracke et al.

Cependant, du fait que l'on utilise un seuil de rétention correspondant à un petit poids moléculaire nominal, ces procédures de diafiltration peuvent être utilisées uniquement pour éliminer les petites molécules solubles, et il est nécessaire de soumettre la solution d'acide hyaluronique diafiltrée à des traitements ultérieurs dans lesquels divers systèmes de précipitation sont impliqués, ce qui rend le procédé complet complexe.

Un objet de la présente invention consiste à obtenir de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé de qualité pharmaceutique ou un sel de celui-ci à partir de n'importe quelle source biologique, en particulier à partir de sources microbiennes, avec un rendement élevé, à un coût relativement faible et sans utilisation de solvants organiques ou d'autres substances ajoutées.

Selon la présente invention, cet objet a été atteint par un procédé de purification de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à ajuster le pH d'une solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique à un pH se situant dans la gamme de 2,0 à 3,5 et ensuite à diafiltrer ladite solution aqueuse au même pH en utilisant un filtre ayant une taille des pores se situant dans la gamme allant d'un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 100 000 Daltons jusqu'à 0,45  $\mu\text{m}$ , suivies par une étape de centrifugation et ensuite une étape de stérilisation.

Grâce à la présente invention, il est possible de purifier de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé pour obtenir avec un rendement élevé de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé de qualité pharmaceutique ou un sel de celui-ci à partir de n'importe quelle source biologique et en particulier à partir d'une source microbienne au moyen d'une seule étape de diafiltration, suivie par des étapes de centrifugation et stérilisation.

Selon la présente invention, l'acide hyaluronique est diafiltré à un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal ou taille des pores qui permet le renvoi de l'acide hyaluronique et le passage à travers le filtre de toutes les substances contenues dans la solution ou le bouillon.

Le procédé de la présente invention peut être appliqué en utilisant n'importe quelle source biologique d'acide hyaluronique.

L'acide hyaluronique de qualité pharmaceutique obtenu par le procédé de la présente invention ne contient aucune trace de solvants organiques ou d'autres substances ajoutées puisque dans le pro-

céde de purification de la présente invention, l'acide hyaluronique n'est pas précipité avec des solvants organiques ou d'autres substances, mais est maintenu en solution aqueuse pendant tout le procédé.

D'autres objets, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée suivante.

La diafiltration, selon la présente invention, d'une solution d'acide hyaluronique provenant d'une source biologique à un pH se situant dans la gamme de 2,0 à 3,5 en utilisant un filtre ayant une taille des pores se situant dans la gamme allant d'un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 100 000 Daltons jusqu'à 0,45  $\mu\text{m}$  conduit à l'élimination de toutes les protéines et autres matières solubles présentes dans la solution aqueuse.

On suppose que lorsque le pH de la solution d'acide hyaluronique est ajusté dans la gamme de 2,0 à 3,5, il se produit une sorte de réticulation réversible où les molécules d'acide hyaluronique forment un réseau qui peut être cassé dans d'autres conditions de pH.

Dans la gamme de pH de 2,0 à 3,5, le réseau est capable d'être retenu par le filtre ayant une taille des pores se situant dans la gamme allant d'un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 100 000 Daltons jusqu'à 0,45  $\mu\text{m}$ , alors que les protéines et les autres produits passent à travers le filtre, rendant ainsi possible la séparation de l'acide hyaluronique de n'importe quelles substances solubles contenues dans la solution.

De préférence, le pH de la solution aqueuse est ajusté à une valeur se situant dans la gamme de 2,0 à 2,7 et ensuite cette solution est diafiltrée au même pH.

Plus préférentiellement, le pH de la solution aqueuse est ajusté à une valeur se situant dans la gamme de 2,5 à 2,7 et ensuite cette solution est diafiltrée au même pH, et plus préférentiellement encore, le pH de la solution aqueuse est ajusté à 2,6 et ensuite cette solution est diafiltrée au même pH de 2,6.

De préférence, le pH est ajusté avec une solution aqueuse de HCl.

Pour les besoins de la présente invention, un filtre particulièrement préféré a une taille des pores de 0,2  $\mu\text{m}$ .

L'acide hyaluronique provenant de n'importe quelle source biologique peut être purifié jusqu'à une qualité pharmaceutique par le procédé de la présente invention.

Par exemple, selon la présente invention, la solution d'acide hyaluronique qui est diafiltrée peut être une solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé obtenu par extraction à partir de cordons ombilicaux, de crêtes de coqs ou autres.

Cependant, dans une forme d'exécution préférée de l'invention, la solution d'acide hyaluronique qui est diafiltrée est un bouillon aqueux contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source microbienne.

La source microbienne est de préférence de type Streptocoque produisant de l'acide hyaluronique à

poids moléculaire élevé, et plus préférentiellement, la source microbienne est choisie parmi les *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* et *Streptococcus pyogenes*.

Un bouillon contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé peut être préparé par n'importe quel procédé bien connu incluant la fermentation d'une culture de Streptocoques produisant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé dans un milieu approprié et dans des conditions appropriées. De tels procédés sont décrits par exemple dans US-A-4 780 414 de Nimrod et al., US-A-5 563 051 de Ellwood et al. ou US-A-5 316 916 de Brown et al.

Le procédé pour préparer un bouillon aqueux contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé selon la présente invention peut être par exemple le suivant:

A la fin d'un procédé habituel de fermentation, le bouillon contenant l'acide hyaluronique est récolté puis transféré dans un réservoir muni d'un dispositif de contrôle automatique de la température.

La température est maintenue à une valeur se situant dans la gamme de 15°C à 25°C, de préférence 20°C.

Le pH du bouillon est ensuite ajusté à 2,4 avec du HCl 6N. A ce pH, le bouillon est transformé en une matière très viscoélastique contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé.

Le bouillon ainsi obtenu peut ensuite être traité selon le procédé de purification de la présente invention en ajustant le pH à une valeur se situant dans la gamme de 2,0 à 3,5 et ensuite en diafiltrant le bouillon aqueux tout en maintenant le même pH pendant toute l'étape de diafiltration.

Dans l'étape de diafiltration, le bouillon aqueux est pompé dans un support de filtre équipé d'un nombre approprié de cartouches de filtre ayant une taille des pores se situant dans la gamme allant d'un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 100 000 Daltons jusqu'à 0,45 µm, de préférence une taille des pores de 0,2 µm et de l'eau distillée exempte de pyrogènes est ensuite ajoutée dans le réservoir contenant le bouillon aqueux, avec un débit identique à celui du filtrat sortant pour maintenir un volume constant.

Dans le procédé de purification de la présente invention, la solution d'acide hyaluronique est de préférence diafiltrée jusqu'à ce que le filtrat qui est éliminé ait une densité optique (DO), à une longueur d'onde de 280 nm, inférieure ou égale à 0,02. Dans ce cas, la densité optique du filtrat à cette longueur d'onde devrait être contrôlée pendant tout le procédé de diafiltration.

Selon la présente invention, l'étape de diafiltration est suivie par une étape de centrifugation afin d'enlever toutes les cellules ou protéines encore présentes dans la solution.

Dans le cas d'une source microbienne, l'étape de centrifugation peut comprendre par exemple l'ajustement du pH du bouillon diafiltré à un pH se situant dans la gamme de 3,0 à 7,0, de préférence à 3,5, et ensuite la centrifugation du bouillon diafiltré, pour obtenir ainsi un surnageant contenant l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé.

Le pH du bouillon diafiltré est de préférence ajusté avec une solution aqueuse de NaOH. Cependant, d'autres solutions aqueuses basiques pourraient être utilisées.

5 Selon la présente invention, l'étape de centrifugation est suivie par une étape de stérilisation.

L'étape de stérilisation est de préférence une étape de stérilisation par filtration.

10 Dans la présente invention, la stérilisation par filtration peut être effectuée selon une méthode de stérilisation par filtration standard.

Selon une forme d'exécution préférée de la présente invention, l'étape de stérilisation par filtration est effectuée en ajustant le pH du surnageant obtenu dans l'étape de centrifugation à une valeur de 7,0 et ensuite en filtrant le surnageant à travers un filtre ayant une taille des pores de 0,2 µm.

15 De préférence, le pH du surnageant est ajusté avec une solution aqueuse de NaOH. Cependant, d'autres solutions aqueuses basiques pourraient être utilisées.

20 Ensuite, la solution stérile peut être concentrée en utilisant un filtre ayant un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 5000 à 10 000 Daltons.

25 Après concentration, la solution stérilisée peut finalement être lyophilisée pour obtenir une poudre sèche d'acide hyaluronique ou d'un sel de celui-ci.

30 L'acide hyaluronique ou un sel de celui-ci obtenu par le procédé de purification de la présente invention a une qualité pharmaceutique et le rendement est d'environ 70-90% en poids par rapport à la teneur en acide hyaluronique dans la solution brute.

35 L'acide hyaluronique ou le sel de celui-ci obtenu par le procédé de purification de la présente invention est remarquable par l'absence de pyrogénicité et d'activité inflammatoire.

40 L'acide hyaluronique ou le sel de celui-ci obtenu par le procédé de purification de la présente invention contient entre 90% et 95% en poids d'acide hyaluronique constitué d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine dans un rapport de 1:1, environ 3% à 5% en poids d'eau, moins que 0,2% en poids de protéines, moins que 0,3% en poids d'acides nucléiques et moins que 0,3% en poids de sucres neutres.

45 Le procédé de la présente invention est très simple et très avantageux du point de vue écologique et économique puisque aucune autre substance que HCl ou NaOH n'intervient.

50 Lorsque le procédé de purification de la présente invention a été utilisé, l'acide hyaluronique ou le sel de celui-ci ne contient aucune trace de solvants organiques.

55 L'exemple suivant du procédé pour obtenir de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé de qualité pharmaceutique ou un sel de celui-ci selon la présente invention est donné uniquement dans un but d'illustration et ne doit pas être considéré comme limitant l'étendue de l'invention.

65

## EXEMPLE

Préparation d'un bouillon aqueux contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source microbienne

Des cellules de Streptococcus equi ont été cultivées à une température de 37°C dans un milieu approprié composé de:

Glucose	60 g
Soytone	15 g
Extrait de levure	5 g
Monohydrogénophosphate de potassium	5,5 g
Sulfate de magnésium eptahydraté	1,2g
Eau exempte de pyrogènes et purifiée	1 l

Dix litres de ce milieu ont été stérilisés et inoculés avec une culture de 1-2% de Streptococcus equi ayant une densité optique (DO) d'environ 7,0 mesurée à une longueur d'onde de 650 nm.

Pendant la fermentation, le pH du bouillon a été maintenu automatiquement à 7,4 par addition de NaOH 5 N. L'aération a été maintenue à 1 volume d'air par volume du milieu par minute, et l'agitation a été maintenue à 250 tpm pendant toute la durée de la fermentation.

Après 20 heures, le bouillon a été récolté et transféré dans un réservoir approprié ayant une capacité au niveau du volume de 50 litres.

Sous agitation continue, le pH du bouillon a été ajusté à 2,4 avec du HCl 6N, pour obtenir ainsi un bouillon très visqueux qui apparaît comme un pâté épais pouvant être enlevé uniquement à l'aide d'instruments.

Procédé de purification selon la présente invention

Le pH du bouillon aqueux contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source microbienne a ensuite été ajusté à 2,6 et maintenu à ce niveau pendant tout le procédé de diafiltration.

Le bouillon aqueux a ensuite été pompé dans un support de filtre équipé de trois cartouches de filtre disposées l'une sur l'autre. Le filtre utilisé est une cassette SARTOCON, Mod. No 302 186 07 06 W-SG fabriquée par SARTORIUM ayant une taille des pores de 0,2 µm.

Au début de l'introduction du bouillon aqueux dans le filtre, la valve du filtrat a été maintenue fermée afin de faire recirculer le bouillon aqueux pendant plusieurs minutes, jusqu'à ce que le système soit stable et qu'aucune bulle ne soit présente dans la partie retenue.

La valve du filtrat a ensuite été ouverte et de l'eau distillée stérile exempte de pyrogènes a été ajoutée de manière continue dans le réservoir contenant le bouillon aqueux, avec le même débit que celui du filtrat sortant, afin de maintenir constant le volume du bouillon aqueux. La pression interne est

maintenue dans la gamme de 1 à 3 bars, de préférence à 2 bars.

La diafiltration a été stoppée lorsque l'absorbance du filtrat à une longueur d'onde de 280 nm était de 0,012 OD. Le filtrat a été éliminé.

Le pH du bouillon diafiltré a ensuite été ajusté à 3,5 avec du NaOH 5N et suite à cela, le bouillon a été centrifugé à 9000 tpm et à 15°C avec une centrifugeuse réfrigérante.

Le pH du surnageant a ensuite été ajusté à un pH de 7,0 avec du NaOH 5N et la solution a été filtrée à travers un filtre ayant une taille des pores de 0,2 µm pour stériliser la solution, conformément à une méthode standard de stérilisation par filtration.

La solution stérile a ensuite été lyophilisée afin d'obtenir une poudre sèche de hyaluronate de sodium.

Dans cet exemple, le rendement en acide hyaluronique a été de 85-87% en poids par rapport à la teneur en acide hyaluronique dans la solution brute et le produit avait les caractéristiques suivantes:

- teneur en hyaluronate de sodium	96,5%
viscosité intrinsèque (25°C) = 2100 ml/g (correspondant à un poids moléculaire de $1,7 \times 10^6$ Daltons)	
- teneur en eau	3,1%
- teneur en protéines	0,08%
- teneur en acides nucléiques	0,01%
- teneur en sucres neutres	0,01%

Le hyaluronate de sodium à poids moléculaire élevé ainsi obtenu peut être utilisé pour préparer des compositions pharmaceutiques.

**Revendications**

1. Procédé de purification de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique afin d'obtenir de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé de qualité pharmaceutique ou un sel de celui-ci, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à ajuster le pH d'une solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique à un pH se situant dans la gamme de 2,0 à 3,5 et ensuite à diafiltrer la solution au même pH en utilisant un filtre ayant une taille des pores se situant dans la gamme allant d'un seuil de rétention correspondant à un poids moléculaire nominal de 100 000 Daltons jusqu'à 0,45 µm, suivies par une étape de centrifugation et ensuite une étape de stérilisation.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique est ajusté à une valeur se situant dans la gamme de 2,0 à 2,7 et ensuite la solution est diafiltrée au même pH.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé

en ce que le pH de la solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique est ajusté à une valeur se situant dans la gamme de 2,5 à 2,7 et ensuite la solution est diafiltrée au même pH.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique est ajusté à 2,6 et ensuite la solution est diafiltrée au même pH de 2,6.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source biologique est ajusté avec une solution aqueuse de HCl.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le filtre utilisé a une taille des pores de 0,2  $\mu\text{m}$ .

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la solution d'acide hyaluronique qui est diafiltrée est un bouillon aqueux contenant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé provenant d'une source microbienne.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la source microbienne est du genre Streptocoque produisant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le genre de Streptocoque produisant de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé est choisi parmi les Streptococcus zooepidemicus, Streptococcus equi et Streptococcus pyogenes.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que la solution d'acide hyaluronique est diafiltrée jusqu'à ce que le filtrat à éliminer ait une densité optique (DO) à une longueur d'onde de 280 nm égale ou inférieure à 0,02.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'étape de centrifugation comprend l'ajustement du pH de la solution aqueuse diafiltrée à un pH se situant dans la gamme de 3,0 à 7,0 et la centrifugation de la solution aqueuse diafiltrée pour obtenir un surnageant contenant de l'acide hyaluronique.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le pH du bouillon aqueux diafiltré est ajusté à 3,5.

13. Procédé selon les revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que le pH est ajusté avec une solution aqueuse de NaOH.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'étape de stérilisation est une étape de stérilisation par filtration.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape de stérilisation par filtration comprend l'ajustement du pH du surnageant obtenu dans l'étape de centrifugation à une valeur de 7 et la filtration du surnageant à travers un filtre ayant une taille des pores de 0,2  $\mu\text{m}$ .

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé

en ce que le pH est ajusté avec une solution aqueuse de NaOH.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que l'étape de stérilisation est suivie par une étape de lyophilisation de la solution stérilisée pour obtenir une poudre sèche d'acide hyaluronique ou du sel de celui-ci.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la solution stérilisée est concentrée avant l'étape de lyophilisation.