



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: B 01 J 39/22
 C 08 B 5/14
 C 08 B 13/00
 C 08 B 37/00



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

⑪

620 597

⑲ Numéro de la demande: 2539/77

⑳ Date de dépôt: 01.03.1977

㉑ Priorité(s): 04.03.1976 NZ 180198

㉒ Brevet délivré le: 15.12.1980

㉓ Fascicule du brevet
 publié le: 15.12.1980

㉔ Titulaire(s):
 Development Finance Corporation of New
 Zealand, Wellington (NZ)

㉕ Inventeur(s):
 John Stephen Ayers, Palmerston North (NZ)
 David Roderick Husbands, Palmerston North
 (NZ)

㉖ Mandataire:
 Prof. Konst. Katzarov S.A., Genève

⑤④ **Procédé de préparation d'un échangeur d'ions sulfaté.**

⑤⑦ On prépare un échangeur d'ions cationiques par sulfatation d'une matrice comprenant un hydrate de carbone réticulé. Ce dernier peut contenir des groupes hydroxy C₂-C₄ alcoyles.

L'hydrate de carbone peut être de la cellulose, de l'agar-agar, de l'agarose ou de la dextrane.

Cet échangeur absorbe sélectivement les lipoprotéines du sérum sanguin ou du plasma.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la préparation d'un échangeur d'ions cationique, caractérisé en ce qu'il comprend la sulfatation d'une matrice insoluble dans l'eau, hydrophile et gonflable à l'eau, comprenant soit

- a) un hydrate de carbone réticulé, soit
- b) un hydrate de carbone réticulé ayant une pluralité de groupes hydroxy C₂—C₄ alcoyle liés chimiquement à ladite matrice.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hydrate de carbone réticulé est un polysaccharide réticulé ou un dérivé de celui-ci contenant des groupes hydroxypolysaccharide ou une pluralité de groupes hydroxy C₂—C₄ alcoyle liés à la matrice.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'hydrate de carbone réticulé est de la cellulose réticulée choisie dans le groupe comprenant la cellulose en fibre naturelle, microgranulaire, microcristalline ou régénérée, ou de la cellulose réticulée, sous l'une de ses formes citées, ayant une pluralité de liaisons avec des groupes hydroxy C₂—C₄ alcoyle.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite matrice est choisie dans le groupe comprenant l'agar-agar, l'agarose et le dextrane.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit agent de sulfatation est soit le produit réactionnel de l'anhydride sulfurique avec une base de Lewis, soit le produit réactionnel de l'acide chlorosulfonique avec une base de Lewis.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit agent de sulfatation est un complexe de pyridine et d'anhydride sulfurique.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la sulfatation est effectuée dans le diméthylformamide ou le formamide, à une température comprise entre 0 et 60°C pendant 0,5 à 6 h, en utilisant 2 à 20 mmol d'agent de sulfatation par gramme de matrice et 5-25 ml de diméthylformamide et de formamide par gramme de matrice.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la sulfatation est effectuée dans la pyridine, à une température comprise entre 50 et 90°C pendant 0,5 à 6 h, en utilisant 2 à 20 mmol d'agent de sulfatation par gramme de matrice et 5-25 ml de pyridine par gramme de matrice.

L'invention se rapporte à un procédé de préparation d'un échangeur d'ions cationique, dont le pouvoir échangeur d'ions est conféré par des groupes sulfates, ainsi qu'à un procédé de préparation de cet échangeur.

Les échangeurs d'ions sont bien connus pour être d'une utilité pratique dans la séparation de composants à partir de mélanges à l'état fluide. Les échangeurs ont été développés pour permettre la séparation par chromatographie des polyélectrolytes à haut poids moléculaire, tels que les protéines («Journal of the American Chemical Society», Vol. 78, 1966 pp. 751-755) et pour retenir sélectivement un composant d'un mélange de macromolécules, par exemple l'albumine sur QAE-Sephadex à partir de toutes les autres protéines du sérum. De tels échangeurs d'ions présentent couramment des groupes qui sont liés à eux, à savoir des groupes acide carboxylique ou sulfonique ou des sels de ces acides, un groupe amino ou un groupe amino quaternaire.

Les échangeurs d'ions agissent par interaction de charges et ne sont pas normalement considérés comme étant particulièrement sélectifs dans la séparation d'espèces de charge similaire dans un mélange fluide.

Il est connu que les groupes sulfates exercent une forte interaction avec les protéines. On a trouvé, de façon inattendue, que des

échangeurs d'ions cationiques sulfatés présentaient une affinité sélective pour les lipoprotéines dans le sérum sanguin.

La séparation fractionnée d'espèces variées de protéines rencontrées dans le plasma ou le sérum sanguin est d'une importance considérable sur le plan médical et sur le plan commercial. Les méthodes de séparation de l'une quelconque des protéines du plasma ou du sérum se sont toutefois heurtées à une série de problèmes d'ordre technique, la plupart résidant dans la présence de quantités appréciables de lipoprotéines. Celles-ci ne sont pas aisément éliminées sélectivement, surtout lorsqu'on opère en grand.

Un échangeur d'ions assurant une séparation sélective des lipoprotéines et présentant une capacité d'écoulement élevée constitue donc un produit hautement recherché et permet de réaliser économiquement les procédés de récupération des sortes de protéines à partir du plasma ou du sérum.

En outre, la quantité de lipoprotéines dans le sang humain présente un intérêt médical considérable. Une concentration élevée en lipoprotéines dans le plasma est fréquemment un phénomène associé à des affections primaires telles que *Diabetes mellitus*, hypothyroïde, protéinurie aiguë et ictère obstructif. En outre, les informations recueillies tendent à établir une corrélation directe entre la concentration en lipoprotéines dans le plasma et l'incidence d'affections cliniques des artères coronaires. Un échangeur d'ions permettant l'application d'une méthode simple de test pour une concentration élevée en lipoprotéines est donc hautement recherché.

On a trouvé qu'on pouvait préparer un échangeur d'ions sulfaté en utilisant des matrices échangeuses d'ions connues et des agents de sulfatation connus. L'importance de la sulfatation d'un tel échangeur d'ions est satisfaisante en vue d'une récupération acceptable des lipoprotéines. On a trouvé que le degré de sulfatation pouvait être augmenté sans incidence sur la diminution du débit, par addition, à la matrice, de groupes hydroxylcoyle inférieur préalablement à la phase de sulfatation.

L'invention a pour but de fournir un échangeur d'ions sulfaté présentant une capacité d'adsorption sélective des lipoprotéines.

L'invention a pour objet un procédé pour la préparation d'un échangeur d'ions cationique, caractérisé en ce qu'il comprend la sulfatation d'une matrice, insoluble dans l'eau, hydrophile et gonflable à l'eau, comprenant soit

- a) un hydrate de carbone réticulé, soit
- b) un hydrate de carbone réticulé ayant une pluralité de groupes hydroxy C₂—C₄ alcoyle liés chimiquement à ladite matrice.

L'invention sera mieux comprise en se référant aux exemples suivants, dans lesquels les exemples 1 à 5, et 7, décrivent des méthodes de préparation d'échangeurs d'ions particuliers selon l'invention. L'exemple 6 se rapporte à la préparation d'un échangeur qui n'a pas été hydroxypropylé, à titre de comparaison, pour le degré de la sulfatation. L'exemple 8 concerne la détermination de la sulfatation. L'exemple 9 constitue un examen des débits de la résine selon l'invention et les exemples 10 et 11 concernent les capacités d'adsorption de la résine selon l'invention.

Exemple 1: Préparation de la cellulose régénérée hydroxylcoyle

Méthode A: Préparation de la cellulose régénérée hydroxypropyle 10-50*

De la cellulose régénérée granulaire (20 g) (75-125), d'une teneur en humidité de 5-7%, est mélangée avec une solution froide à 30% d'hydroxyde de sodium (poids/volume) (30 ml), 2 ml d'épichlorhydrine (10% volume/poids, par rapport à la cellulose) et 10 ml d'oxyde de propylène (50% volume/poids, par rapport à la cellulose). Le mélange est agité à fond, jusqu'à ce que la cellulose ait fini de gonfler et que tout le liquide ait été absorbé. La cellulose humidifiée est ensuite placée dans un récipient qui est scellé avant d'être chauffé à 60°C, sans autre mélange. Après 2 h, le récipient

réactionnel est refroidi à la température ambiante, ouvert, et les produits contenus sont transvasés dans un grand volume d'eau agitée (500 ml). Les particules d'hydroxypropylcellulose sont rassemblées sur filtre Buchner, lavées convenablement à l'eau et, finalement, séchées suivant l'une des méthodes 1) ou 2) ci-après. Le produit (20 g) est placé dans un récipient clos jusqu'à ce qu'il serve pour la sulfatation.

Méthodes de séchage

- 1) Le produit est déshydraté par échange de solvant en méthanol, à travers une série progressive de mélanges méthanol/eau. Le méthanol en excès est éliminé et le produit est chauffé à 60°C sous pression réduite.
- 2) Le produit est lyophilisé. Le dernier 1% d'humidité peut être éliminé par séchage à l'air à 60°C, sans affecter le caractère réactionnel de ce produit.

* 10-50 correspond au % (volume/poids par rapport à la cellulose) d'épichlorhydrine et d'oxyde de propylène utilisés dans la préparation.

En utilisant cette méthode, des celluloses régénérées hydroxypropylées peuvent être préparées suivant une gamme de volumes de gonflement. Des exemples de ces celluloses sont donnés au tableau I. Les mesures sont faites après que les produits ont été séchés suivant la méthode 1).

Tableau I

Volumes de lits déposés de celluloses régénérées hydroxypropylées dans l'eau (ml/g)

	6	8	10	20% Epichlorhydrine
Oxyde de propylène	30	8	9	8,5
(%)	50	12,5	11,0	9,5
	100	17,4	16,0	11,6
				8,4

Le rendement du produit insoluble dans l'eau décroît lorsque la quantité réticulé décroît et s'élève, avec 1% d'épichlorhydrine, à 40% du poids initial de cellulose utilisée. Avec 6, 8 et 10%, les rendements s'élèvent respectivement à 84, 94 et 100%.

Méthode B: Préparation de cellulose régénérée hydroxyéthylée.

De la cellulose régénérée granulaire (10 g) est mise en suspension dans 50 ml de toluène. A cette suspension, on ajoute alors 10 ml d'hydroxyde de sodium aqueux à 60%, puis 8 ml d'éthylènechlorhydrine et 0,5 ml d'épichlorhydrine. La température du mélange est ensuite montée à 60°C et on laisse la réaction s'effectuer pendant 2 h sous agitation. Après décantation du toluène, le produit est dispersé dans de l'eau rapidement agitée et rassemblé sur filtre Buchner à verre fritté. Le produit est lavé à fond à l'eau, déshydraté à l'acétone et séché sous pression réduite à 50°C. Il présente un volume de lit déposé de 8 ml/g dans l'eau.

Exemple 2: Préparation de sulfate de cellulose régénérée hydroxypropylée (forme Na⁺)

Méthode A:

De la cellulose régénérée hydroxypropylée 10-50 (1 g), séchée suivant la méthode 1) de l'exemple 1 ci-dessus, un complexe pyridine/anhydride sulfurique (1 g) et de la pyridine anhydre (10 ml) sont placés dans un erlenmeyer protégé par un tube de séchage et chauffé au bain d'huile à 80°C pendant 1,5 h. L'erlenmeyer secoué périodiquement à la main au cours de la réaction, puis refroidi avant de transvaser le mélange dans 20 ml d'eau désionisée. Le produit sulfaté est recueilli sur un filtre en verre fritté et lavé à fond avec encore plus d'eau désionisée. Pour le transformer de pyridinium en ion sodium, il est titré dans le chlorure de sodium 1M avec de l'hydroxyde de sodium 0,1M jusqu'à réaction

finale à la phénolphthaléine, puis rassemblé et lavé de nouveau sur le filtre. Le sulfate de cellulose régénérée hydroxypropylée présente un pouvoir échangeur d'ions de 0,37 mEq/g et un volume de lit décanté de 8,5 ml/g dans l'eau.

Méthode B:

1 g de cellulose régénérée hydroxypropylée et lyophilisée du type 8-50, le complexe pyridine/anhydride sulfurique (2 g) et du diméthylformamide anhydre (10 ml) sont placés dans un tube qui est ensuite bouché, puis agités modérément à 20-25°C pendant 2 h. Le produit sulfaté est obtenu comme décrit en A ci-dessus, et présente un pouvoir échangeur de 4,3 mEq/g et un volume de lit déposé de 12 ml/g dans l'eau. Des pouvoirs allant jusqu'à 5,5 mEq/g sont obtenus par cette méthode en utilisant jusqu'à 4 g de complexe pyridine/anhydride sulfurique, avec des temps de réaction atteignant 4 h.

Le produit sulfaté est placé dans l'eau désionisée en présence de 0,02% d'azide de sodium comme agent préservatif, et est ainsi conservé pendant 6 mois à 25°C sans perte appréciable de groupes sulfates. Le produit peut être également déshydraté par échange de solvant, par exemple dans le méthanol, et séché sous pression réduite à 20°C sans affecter son aptitude à regonfler par humidification, ni son aptitude à lier des lipoprotéines. Le rendement en produit est supérieur à 98%, compte tenu de l'accroissement en poids résultant de l'introduction des groupes chargés ($-\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$) à la place de l'hydroxyle.

Exemple 3: Préparation de l'hydroxypropylcellulose.

De la cellulose microgranulaire (20 g) (cellulose Whatman en poudre CC31 de W & R Balston Ltd., Grande-Bretagne) est mélangée avec une solution aqueuse froide à 20% (poids/volume) d'hydroxyde de sodium (30 ml), de l'épichlorhydrine (2 ml) et de l'oxyde de propylène (10 ml). Après avoir mélangé soigneusement les produits réactionnels, la cellulose en poudre humidifiée est placée dans un récipient et abandonnée à 20°C pendant 24 h. Elle est ensuite transvasée dans 4 l d'eau agitée. Le produit est lavé, déshydraté et séché de la même manière que la cellulose régénérée hydroxypropylée (exemple 1A) pour donner 18,7 g de produit avec un volume de lit décanté de 7,6 ml/g dans l'eau.

Exemple 3: Préparation de l'hydroxypropylcellulose.

Cette préparation s'effectue de la même manière que dans l'exemple 2A, en utilisant de l'hydroxypropylcellulose préparée comme dans l'exemple 3. En utilisant 0,5, 1 et 2 g de complexe pyridine/anhydride sulfurique, on obtient des produits présentant des pouvoirs échangeurs d'ions, respectivement de 0,56, 2,24 et 4,31 mEq/g.

Exemple 5: Préparation du sulfate de dextranehydroxypropyl (Forme Na⁺)

Du dextrane réticulé hydroxypropyl (1 g) (Sephadex LH-20, de Pharmacia Fine Chemicals AB, Suède), le complexe pyridine/anhydride sulfurique (2 g) et de la pyridine anhydre (10 ml) sont placés dans un erlenmeyer protégé de l'humidité atmosphérique par un tube de séchage et chauffés au bain d'huile à 80°C pendant 1,5 h. L'erlenmeyer est secoué périodiquement au cours de la réaction, puis refroidi, avant de transvaser le mélange réactionnel dans 200 ml d'eau désionisée. Le produit sulfaté est recueilli sur un filtre en verre fritté et lavé à fond avec encore plus d'eau désionisée. Il est finalement neutralisé à l'hydroxyde de sodium 0,1M, puis recueilli et lavé de nouveau sur le filtre. La matrice réticulée de dextrane présente, après sulfatation, un pouvoir échangeur d'ions de 4,1 mEq/g et un volume de lit décanté de 5,0 ml/g dans l'eau.

Exemple 6: Préparation de sulfate de dextrane réticulé.

Du dextrane réticulé anhydre (1 g) (Sephadex G-25, de Pharmacia Fine Chemicals AB, Suède) est sulfaté dans 10 ml de for-

amide anhydre avec 2 g de pyridine/anhydride sulfurique, comme décrit dans l'exemple 5. Le produit présente un pouvoir échangeur d'ions de 2,47 mEq/g et un volume de lit décanté de 8,3 ml/g.

Exemple 7: Préparation de sulfate d'agarose réticulée.

Une bouillie aqueuse d'agarose réticulée (Sephacrose CL-6B de Pharmacia Fine Chemicals AB, Suède) est transvasée sur un filtre Buchner en verre fritté, l'excès d'eau étant éliminé par aspiration. 15 g de l'agarose humide sont échangés avec DMF à travers une série progressive de mélanges DMF/eau, puis lavés finalement avec DMF anhydre. Les perles de CL-agarose, en suspension dans DMF, sont ensuite sulfatées par addition de complexe pyridine/SO₃ et agitation modérée du mélange pendant 4 h à 20-25° C. Après dispersion dans l'eau désionisée, le produit est recueilli sur un filtre Buchner en verre fritté, et lavé à fond avec de l'eau désionisée. Un dosage indique que le produit renferme 5,4 mmol de groupes sulfates (3,1 mEq/g). Cet échangeur d'ions lie 5,2 mg de cholestérol par gramme, lorsqu'il est testé avec une solution de lipoprotéines, comme décrit dans l'exemple 11.

*Exemple 8: Détermination du degré de sulfatation.
(pouvoir échangeur d'ions)*

Le degré de sulfatation est déterminé à partir du volume d'hydroxyde de sodium 0,1M utilisé pour neutraliser l'ion pyridinium déplacé par la matrice sulfatée et en admettant un rendement de 100% de la matrice lors de la réaction. La validité de cela est illustrée dans bien des cas où le produit est séché. Le rendement est supérieur à 98% de celui calculé à partir du poids de matrice utilisé et du nombre de groupes -OSO₃Na introduits à la place des groupes hydroxyles. Cette méthode d'analyse est vérifiée par ailleurs par l'analyse du soufre sur le produit séché.

Comparaison des méthodes d'analyse

mEq/g (par titration)	(%) soufre (calculé)	(%) soufre (microanalyse)
1,42	4,55	4,65
3,67	11,75	11,61

Exemple 9:

Les débits, mesurés sur plusieurs matrices sulfatées, sont les suivants:

Sulfate de cellulose régénérée hydroxypropylée (4,3 mEq/g); exemple 2B: 130 cm/h.

Sulfate d'hydroxypropylcellulose (4,31 mEq/g); exemple 4: 32 cm/h.

Sulfate d'agarose réticulée (3,1 mEq/g); exemple 7: 45 cm/h.

Dans chaque cas, l'épaisseur du lit est de 10 cm, et l'écoulement est maintenu avec une pression différentielle hydrostatique de 70 cm à travers les colonnes, en utilisant NaCl comme éluant.

Bien que la cellulose régénérée granulaire elle-même, et les échangeurs d'ions préparés à partir de celle-ci (brevet américain N° 3573277) soient connus comme présentant d'excellents débits lorsqu'ils sont placés dans une colonne (240 cm/h dans les mêmes conditions que décrit ci-dessus), il est surprenant de constater que de tels débits élevés peuvent encore être atteints après que les particules de cellulose régénérée ont été substituées par des groupes hydroxypropyles fournissant des perles plus lisses et plus gonflées.

Exemple 10: Utilisation des échangeurs d'ions sulfatés.

Une colonne est garnie avec l'échangeur d'ions sulfatés de cellulose régénérée hydroxypropylée 8-50 (1 mEq/g) préparé comme décrit dans l'exemple 2A. Elle est équilibrée avec un volume de colonne de chlorure de magnésium 0,5M renfermant du bicarbonate de sodium 0,01M et ajustée à pH 7,4. Lorsque le sérum dilué 1:1 avec le chlorure de magnésium 1M et ajusté à pH 7,4 avec

l'hydroxyde de sodium 0,1M est passé à travers la colonne, les lipoprotéines de très faibles densité (VLDL) et les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont séparées sélectivement et quantitativement. Toutes les autres protéines, y compris la troisième fraction de lipoprotéines de haute densité (HDL), passent directement à travers la colonne et sont lavées avec un autre volume de colonne d'une solution de chlorure de magnésium 0,5M (pH 7,4), comme utilisé initialement pour équilibrer la colonne. Les lipoprotéines (VLDL et LDL) liées à la colonne sont éluées par une solution de chlorure de sodium 0,25M et de citrate trisodique 0,25M, qui a été ajustée à pH 8,4 avec l'acide chlorhydrique 1M. (Suivant une variante, ces lipoprotéines peuvent être éluées rapidement avec le chlorure de sodium 1M). Les lipoprotéines éluées ne sont pas contaminées par d'autres protéines du sérum, par immunoelectrophorèse et électrophorèse sur agarose. De façon identique, les protéines du sérum qui passent directement dans la colonne sont rendues exemptes de VLDL et de LDL par immunoelectrophorèse et électrophorèse sur agarose.

La fraction HDL peut également être retenue sur la colonne, en utilisant un échangeur d'ions plus hautement substitué, par exemple 3-5 mEq/g, mais cela n'est pas toujours nécessaire, étant donné que c'est habituellement les LDL et VLDL qui sont la principale cause de perturbation dans les fractionnements des protéines du sérum. Le débit de sérum à travers la colonne échangeuse est tel que les lipoprotéines peuvent être séparées à partir de 5 ml de sérum, avec une durée de 15 mn, de plus grandes colonnes pouvant être utilisées également avec de bonnes caractéristiques d'écoulement. D'une façon tout à fait inattendue par rapport aux méthodes antérieures d'élimination sélective des lipoprotéines du sérum, l'utilisation de l'échangeur d'ions permet de réaliser la séparation quantitativement et rapidement.

En conséquence, lorsqu'on utilise principalement un tel procédé, il peut faciliter la séparation des autres protéines du sérum. Par exemple, dans la préparation de l'IgG à partir du sérum, toutes les autres protéines sont adsorbées sur une colonne de QAE Sephadex, laissant l'IgG passer directement à travers la colonne (protides des fluides biologiques; travaux du 17^e colloque, 1969, pp. 511-515). Toutefois, le volume du sérum dilué, chargé sur la colonne, ne peut excéder 75% du volume de la colonne, ou les LDL et VLDL pénètrent à travers la colonne et contaminent l'IgG. En séparant les LDL et les VLDL en premier lieu sur une colonne d'échangeur d'ions sulfaté, puis en effectuant la préparation de l'IgG, comme indiqué dans la référence ci-dessus, une quantité égale à trois fois celle du sérum peut être chargée sur la colonne QAE-Sephadex, sans contamination de l'IgG qui demeure séparé.

Exemple 11: Pouvoirs de liaison des lipoprotéines pour les échangeurs d'ions sulfatés.

En vue de mesurer la capacité ou le pouvoir que possèdent les échangeurs d'ions sulfatés à lier les lipoprotéines, chacun de ceux-ci sont placés dans une pipette de Pasteur, afin de réaliser une petite colonne de volume 1,5 ml. Les pouvoirs de liaison des lipoprotéines pour ces échangeurs sont déterminés en utilisant une fraction de lipoprotéines de faible densité (VLDL et LDL) préparée par ultra-centrifugation, puis dialysée à l'encontre d'un tampon de bicarbonate de sodium 0,01M, pH 7,4. La fraction de lipoprotéines est préparée à son volume initial de sérum, avec le même tampon, puis diluée 1:1 avec une solution renfermant du chlorure de sodium 0,01M, ajustée également à pH 7,4, de façon que la solution de lipoprotéines diluée présente une concentration finale en sel de 0,05M et une concentration en chlorure de sodium de 0,5M. La méthode suivante est utilisée pour chacune des colonnes:

La colonne est équilibrée avec 10 ml de solution A renfermant 0,05M de chlorure de sodium, 0,5M de chlorure de magnésium, 0,01M de bicarbonate de sodium et ajustée à pH 7,4. 5 ml de la solution de lipoprotéines sont passés à travers la colonne et lavés avec 5 ml de la solution A, puis par 2 ml de tampon de bicarbonate de sodium 0,01M, pH 7,4. Les lipoprotéines sont ensuite éluées de

la colonne avec du chlorure de sodium 1M et rassemblées dans 2 ml. La teneur en cholestérol de ces 2 ml est déterminée par mesure quantitative de la quantité de lipoprotéines liées ou retenues par la colonne. L'échangeur d'ions dans la colonne est finalement lavé et séché à l'étuve à 60°C, afin de déterminer son poids à sec.

Les résultats des mesures des pouvoirs des échangeurs sulfatés choisis, effectuées conformément à cette méthode, sont indiqués au tableau II.

Tableau II

Echangeurs d'ions sulfatés		Pouvoirs en lipoprotéines mg cholestérol/g
Matrice	mEq/g	
Cellulose microgranulaire	10-50	2,24
Cellulose microgranulaire	10-00	2,11
Cellulose microgranulaire	50-00	2,06
Cellulose régénérée	8-50	2,11
Cellulose régénérée	10-00	faible
Cellulose régénérée	50-00	2,32
Cellulose régénérée	100-00	1,53
Dextrane réticulé	LH-20	2,65
Dextrane réticulé	G-25	2,38
Agarose réticulée		3,1

Cette méthode est répétée en utilisant le sérum à partir duquel les lipoprotéines de faible densité ont été séparées par ultracentrifugation. Cela donne une mesure du pouvoir échangeur d'ions pour HDL, du fait qu'aucune des autres protéines du sérum n'est liée dans ces conditions.

Exemple 12: Matrices cellulosiques.

Généralités

La cellulose est employée sous la forme de fibre naturelle ou sous la forme microcristalline, microgranulaire ou régénérée, laquelle est réticulée et a fixé des groupes hydroxylalcoyles. La cellulose régénérée est obtenue soit à partir du xanthate, soit par le procédé cupro-ammonium, suivant une variété de formes, par exemple forme granulaire, en poudre ou en perles rondes produites par des méthodes connues :

— par broyage de baguettes sèches, filaments, flocons, films, etc.

en poudre

— par pulvérisation de la solution de cellulose dans le bain de régénération (brevet néo-zélandais N° 167838)

en forme de perles

— par dispersion de la solution de cellulose en microgouttes par agitation vigoureuse, en présence d'un solvant organique non miscible à l'eau, avant régénération. («Journal of Polymer Science»: Part C 36, 1971, p. 280). (brevet anglais N° 1293611).

L'agent de réticulation utilisé peut être en principe un composé bifonctionnel de formule X—R—Y, dans laquelle X et Y sont, chacun, des groupes halogènes ou époxy, et R est un résidu aliphatique. Des agents de réticulation types sont indiqués sur le tableau III.

Tableau III

Epichlorhydrine
Dichlorhydrine
Dibromopropanol
1,2:3,4-Diépoxybutane
Bisépoxypropyléther
Éthylèneglycolbisépoxypropyléther
1,4-Butanediolbisépoxypropyléther

La réticulation est effectuée en faisant réagir la cellulose ou la cellulose régénérée en présence d'une base et d'eau. Des hydroxydes de métaux alcalins, principalement l'hydroxyde de sodium et l'hydroxyde de potassium, sont utilisés comme base. Toutefois, d'autres substances à réaction alcaline, telles que des composés d'ammonium quaternaire peuvent être également utilisés. Les propriétés du produit fini dépendent du degré de réticulation utilisé. Cela peut être réglé en relation avec les propriétés finales requises. Le degré de réticulation est de 1 à 50% mais, plus spécialement, de 4 à 20%, exprimé en fonction du poids d'agent de réticulation par rapport au poids sec de cellulose. Il est avantageux que le degré de réticulation utilisée dans un cas donné dépende de la matrice particulière utilisée et du nombre de groupes d'activation hydroxylalcoyles substitués sur cette matrice. Des degrés de réticulation supérieurs sont parfois nécessaires, par exemple si la réticulation est effectuée avant la régénération de la cellulose.

Les groupes hydroxylalcoyles peuvent être ajoutés à la cellulose ou à la cellulose régénérée, en même temps qu'on effectue la réticulation, par addition d'un alcoylène-oxyde ou d'une alcoylènehalohydrique à l'hydroxyde de métal alcalin, l'eau et l'agent de réticulation. Par exemple, des groupes hydroxypropyles peuvent être ajoutés en utilisant de l'oxyde de propylène ou des groupes propylène/chlorohydrine et hydroxyéthyles, par emploi d'oxyde d'éthylène ou d'éthylènechlorohydrine. Les quantités utilisées sont de préférence comprises entre 20 et 200%.

La quantité d'eau présente dans la réaction est suffisante pour dissoudre la base et gonfler la matrice, mais pas si importante pour provoquer des réactions secondaires excessives avec l'agent réactionnel hydroxylalcoylant. Afin de réduire au minimum ces réactions secondaires, la réaction peut être effectuée de façon appropriée en présence d'un solvant non miscible à l'eau, par exemple le toluène. Ce solvant peut également servir comme moyen d'enlèvement de chaleur et assure une distribution plus uniforme des produits réactionnels, tout en permettant d'utiliser une température réactionnelle plus élevée, si l'un de ces produits est de bas point d'ébullition.

Suivant une variante, et dans le cas de la cellulose régénérée, les groupes de réticulation et/ou les groupes hydroxylalcoyles peuvent être incorporés avant la régénération finale de la cellulose, cela au moyen de méthodes connues dans la technique (brevet néo-zélandais N° 167838).

L'invention sera mieux comprise en se référant au dessin annexé, sur lequel :

Les fig. 1 et 2 sont des courbes illustrant le degré de sulfatation exprimé en milliéquivalents par gramme en fonction du temps, pour sept exemples différents de cellulose régénérée. Les indices 100-0, etc. ont la même signification, telle qu'expliquée à propos de l'exemple 1.

Les fig. 3 et 4 sont des courbes illustrant la capacité ou pouvoir d'adsorption de l'échangeur d'ions pour les lipoprotéines, respectivement de faible densité et de haut densité, comme expliqué à l'exemple 11, en fonction du degré de sulfatation de l'échangeur d'ions exprimé en milliéquivalents par gramme. Les indices 6-50, etc. ont la signification déjà expliquée à l'exemple 1. LH-20 concerne le Sephadex LH-20 sulfaté, comme décrit dans l'exemple 5.

La fig. 1 montre que la réactivité de la cellulose régénérée réticulée décroît vers la sulfatation, lorsque la quantité en réticulation diminue. Les conditions de la réaction sont celles indiquées dans l'exemple 2A, en utilisant 2 g de complexe pyridine/anhydride sulfurique. Des réactivités similaires sont observées par préimprégnation dans le DMF pendant 16 h, puis en effectuant la réaction dans le DMF à 20-25°C.

Bien que la cellulose régénérée préparée en utilisant 50 et 100% puisse être sulfatée de façon satisfaisante, elle présente des capacités inférieures pour la liaison des lipoprotéines, spécialement lorsqu'elle est exprimée en fonction du poids sec d'échangeur d'ions sulfaté nécessaire (voir fig. 3 et 4).

La fig. 2 montre de quelle manière la réactivité de la cellulose

régénérée se trouve, vis-à-vis de la sulfatation, fortement améliorée par la présence de groupes ajoutés hydroxypropyles. Les conditions de la réaction sont celles indiquées dans l'exemple 2A, en utilisant 2 g de complexe pyridine/anhydride sulfurique.

Les fig. 3 et 4 illustrent le pouvoir amélioré des échangeurs d'ions sulfatés préparés à partir de matrices hydroxypropylées, comparativement à celui obtenu en utilisant de hauts degrés de réticulation (100%), mais sans oxyde de propylène.

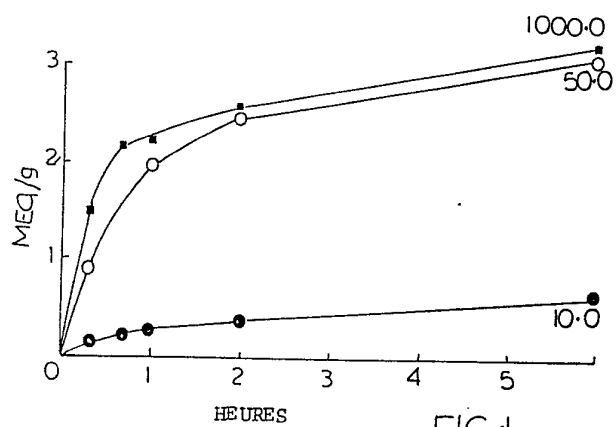


FIG. 1.

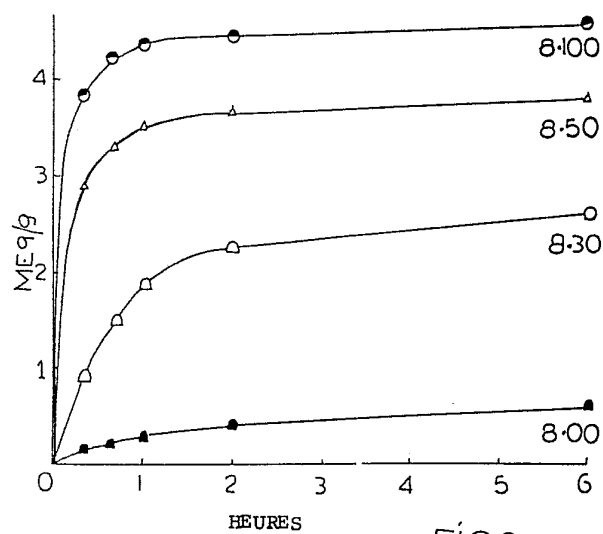


FIG. 2.

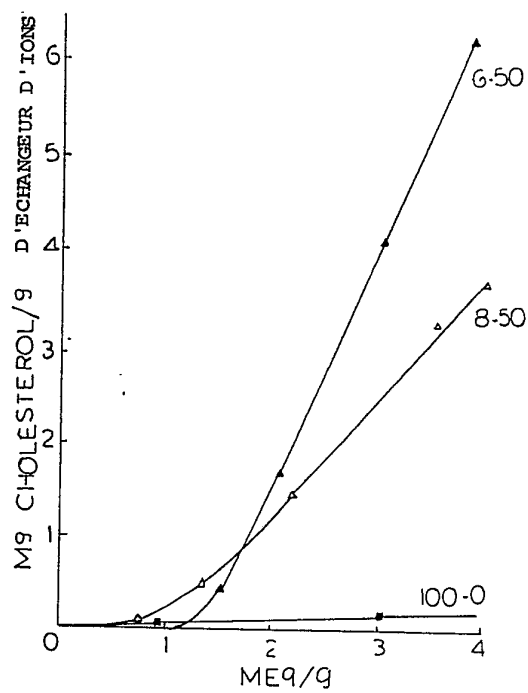
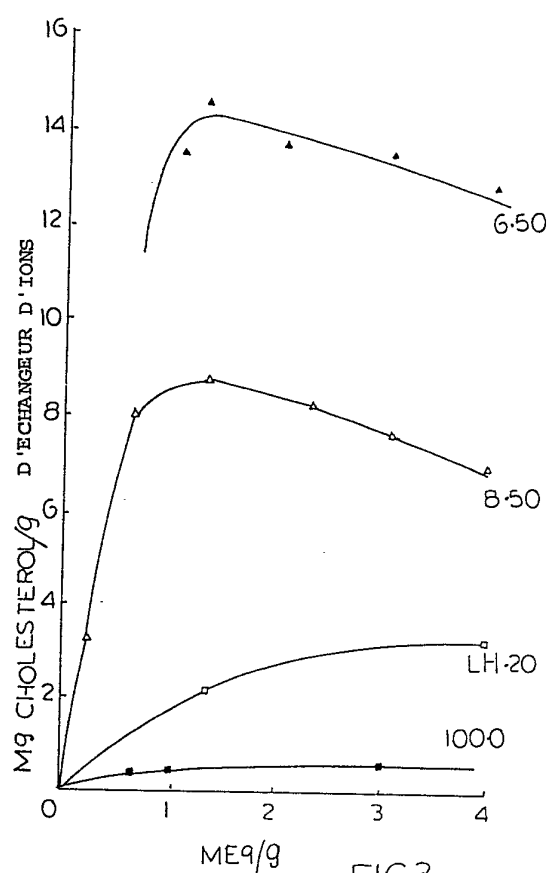


FIG 4.