

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 582 002

(21) N° d'enregistrement national :

86 03144

(51) Int Cl⁴ : C 08 B 37/08.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 6 mars 1986.

(71) Demandeur(s) : Société dite : BIOMATRIX, INC. — US.

(30) Priorité : US, 12 mars 1985, n° 710 929.

(72) Inventeur(s) : Endre A. Balazs, Adolf Leshchiner, Adelya Leshchiner et Philip Band.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 47 du 21 novembre 1986.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux appartenants :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Aymard et Coutel.

(54) Préparation à base d'acide hyaluronique chimiquement modifié et son procédé d'obtention à partir de tissus animaux.

(57) Préparation à base d'acide hyaluronique chimiquement modifié et son procédé d'obtention à partir de tissus animaux.

La préparation d'acide hyaluronique chimiquement modifié est caractérisée par la présence d'une faible quantité (0,005-0,05 % en poids) de groupes aldéhyde de réticulation liés de manière covalente aux chaînes moléculaires d'acide hyaluronique. Le procédé consiste à traiter *in situ* l'acide hyaluronique dans des tissus animaux le contenant, le traitement se faisant avec un mélange comportant un réactif, notamment un aldéhyde, qui réagit avec l'acide hyaluronique et les protéines contenus dans le tissu animal.

A1

FR 2 582 002 - A1

D

L'invention est relative à une préparation à base d'acide hyaluronique chimiquement modifié qui se caractérise par de nouvelles propriétés chimiques, physico-chimiques et rhéologiques ; elle concerne également un nouveau procédé 5 pour obtenir cette préparation.

L'acide hyaluronique (ci-après dénommé AH) est un glycosaminoglycane de poids moléculaire élevé qui se rencontre naturellement et qui présente une unité disaccharide répétée d'acide D-glucuronique et de N-acétylglucosamino-2- 10 acétamido-2-désoxy-D-glucose reliée par une liaison glucosidique $\beta 1 \rightarrow 3$. Les disaccharides sont reliées pour former, avec des liaisons glucosidiques $\beta 1 \rightarrow 4$, une chaîne polysaccharide sans embranchement et non réticulée.

L'acide hyaluronique se trouve dans les tissus animaux 15 tels que le cordon ombilical, l'humeur vitrée, le liquide synovial, les crêtes-de-coq, la peau, etc. Le poids moléculaire de l'acide hyaluronique purifié est cité, dans la littérature, comme étant situé dans la gamme de 50 000 à 8 000 000 selon la source, la méthode d'isolation et la méthode de détermination du poids moléculaire (Balazs, E.A., Fed. Proceed. 20 17, 1086-1093 (1958)).

Plusieurs méthodes ont été suggérées pour obtenir ou 25 récupérer et purifier l'acide hyaluronique à partir des tissus animaux et des cultures bactérielles. Parmi ces procédés on citera la digestion enzymatique de protéines (E.D.T Atkins, C.F. Phelps et J.K. Sheehan, Biochem. J. 128, 1255-1263, (1972) ; R. Varma, R.S. Varma, W.S. Alten et A.H. Wardi, Carbohydr. Res. 32, 386-395, (1974)) ; le traitement par des résines avec échange ionique (T.C. Laurent, J. Biol. Chem. 30 216, 263-271, (1955) ; E.R. Berman, Biochim. Biophys. Acta 58, 120-122 (1962)) ; la précipitation avec des surfactants ou tensionactifs cationiques (T.C. Laurent, M. Ryan, et A. Pietruszkiewicz, Biochem. Biophys. Acta 42, 476-485 (1960)) ; le traitement par l'acide trichloroacétique (H. Hofmans, O. 35 Schmut, H. Sterk, et H. Koop, Naturforsch. 34c, 508-511 (1979) ; D. Schmut, et H. Hofmans, Biochim Biophys. Acta 673, 192-196 (1981)) ; la sédimentation préparative à gradient de densité (P. Silpanata, J.R. Dunstone, A.G. Ogston, Biochem. J. 109,

43-50 (1968)) ; et l'électrodéposition (S. Roseman, D.R. Watson, J.F. Duff, et W.D. Robinson "Annals Rheumatic Diseases", 15, 67-68 (1955)). On peut également utiliser un procédé qui comporte plusieurs traitements différents, par exemple une digestion et une précipitation enzymatiques avec du chlorure de cétylpyridinium (J.E. Scott, Biochem. J., 62, 31 (1956)).

La principale difficulté rencontrée dans la récupération de l'acide hyaluronique à partir d'une source biologique implique la séparation du polymère (AH) à partir de protéines et des autres polymères biologiques qui sont extraits du tissu en même temps que l'acide hyaluronique. Selon la matière brute, la quantité de polymères non désirables peut varier très largement, en dépassant par exemple de plusieurs fois la quantité d'acide hyaluronique. Les procédés cités ci-dessus pour la récupération de l'acide hyaluronique sont tous utilisés pour la préparation de l'acide hyaluronique en laboratoire, mais ils peuvent difficilement être utilisés pour une production de l'acide hyaluronique à grande échelle en raison des divers inconvénients inhérents à chacun de ces procédés.

Le procédé le plus avancé pour la récupération et la purification de l'acide hyaluronique à une échelle industrielle est décrit dans le Brevet américain 4 141 973 (E.A.Balazs). Selon ce procédé, un acide hyaluronique ultra-pur, avec une teneur en protéine inférieure à 0,5 % en poids et présentant un poids moléculaire supérieur à 1.200.000, est obtenu par extraction aqueuse à partir de crêtes-de-coq ou de cordon ombilical humain. Les protéines et autres substances sont enlevées par plusieurs extractions au chloroforme à des valeurs de pH variables. Dans une extraction au chloroforme de l'extrait aqueux, il se forme un interface dans lequel les protéines dénaturées et les autres substances sont collectées. Certaines substances, par exemple les graisses, sont solubilisées, probablement dans la phase chloroforme. La procédé peut également comporter un traitement avec un enzyme protéolytique, par exemple la pronase. En combinant plusieurs traitements très élaborés, on a développé un procédé qui permet d'obtenir une fraction d'acide hyaluronique ne provoquant pas

la fièvre et non inflammatoire. Ce produit est actuellement sur le point d'être commercialisé comme solution à 1 % sous la marque Healon^R, et il est utilisé en viscochirurgie dans laquelle il protège les tissus contre les dommages mécaniques, donne de l'espace et permet la manipulation des tissus pendant l'intervention chirurgicale (E.A. Balazs, Healon, J. Wiley et fils, NY, 1983, pp 5-28).

On comprendra bien l'invention à la lecture de la description qui va suivre et en référence aux dessins annexés dans lesquels :

FIG. 1 est un graphique montrant la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour une solution à 1 % de HY dans du NaCl aqueux 0,15 M, V représentant la viscosité et S la contrainte de cisaillement ;

FIG. 2 est un graphique donnant les résultats d'un test d'oscillation pour une solution à 1 % en poids de HY dans du NaCl aqueux à 0,15 M, V étant la viscosité, F l'angle de phase, G' le module de stockage dynamique et G" le module de perte ;

FIG.3 est un graphique montrant la courbe de relaxation pour une solution à 1 % en poids de HY dans du NaCl aqueux à 0,15 M ;

FIG.4 est un graphique montrant la distribution des diamètres sphériques équivalents pour une solution à 1% en poids d'acide hyaluronique dans du NaCl aqueux à 0,15 M, avec une valeur de viscosité limite de 4.300 cc/g. ;

FIG.5 est un graphique montrant la distribution des diamètres sphériques équivalents pour une solution à 1% en poids de AH dans du NaCl aqueux à 0,15 M, avec une valeur de viscosité limite de 3.562 cc/g. ;

FIG.6 est un graphique montrant la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour un produit selon l'invention du type gelée ;

FIG. 7 est un graphique montrant les résultats d'un test d'oscillation d'un produit selon l'invention du type gelée, V étant la viscosité, F l'angle de phase, G' le module de stockage dynamique et G" le module de perte, et

FIG. 8 est un graphique montrant la courbe de relaxation pour un produit selon l'invention du type gelée.

Suivant un aspect, la présente invention fournit un procédé nouveau pour la modification chimique *in situ* d'acide hyaluronique dans des tissus animaux avant son extraction à partir de ceux-ci.

5 Suivant un autre aspect, l'invention fournit un procédé nouveau pour la récupération et la purification d'acide hyaluronique chimiquement modifié à partir de tissus animaux.

10 Suivant un autre aspect encore l'invention fournit un acide hyaluronique chimiquement modifié, ultra-pur, ne donnant pas de fièvre et non inflammatoire, qui contient d'environ 0,005 % à 0,05 % en poids de groupes aldéhyde de réticulation liés de manière covalente aux chaînes polymères d'acide hyaluronique.

15 La présente invention est basée sur la découverte que l'acide hyaluronique peut être chimiquement modifié *in situ* avant qu'il soit extrait des tissus animaux, en traitant les tissus avec une substance qui réagit avec les protéines et l'acide hyaluronique en milieu aqueux. Parmi ces substances figurent le formaldéhyde, le glutaraldéhyde, le glyoxal, etc.

20 On a constaté que cette modification chimique *in situ* entraîne des modifications substantielles dans la structure primaire de la macromolécule d'acide hyaluronique, dans la taille de la molécule, dans les interactions inter et intramoléculaires et dans les propriétés résultantes rhéologiques des

25 solutions fabriquées à partir du produit modifié. Il est par conséquent justifié de donner à cet acide hyaluronique chimiquement modifié un nouveau nom. Il a été choisi de nommer cette matière Hylan (ci-après identifiée en abrégé par HY). Quand

30 l'acide hyaluronique est extrait d'un tissu animal, une grande quantité de protéines passe habituellement dans la solution avec lui. La quantité de protéines peut varier sensiblement en fonction de la nature du tissu et des paramètres de l'extraction. Dans l'extraction de l'acide hyaluronique à

35 partir des crêtes-de-coq, le rapport pondéral de l'acide hyaluronique aux protéines peut varier de 1/0,5 à 1/4 (voir le Brevet américain 4 303 676). Il en résulte que la première difficulté dans la récupération de l'acide hyaluronique pur à partir d'un tissu animal réside dans l'élimination des pro-

téines. On a constaté que le traitement préliminaire mentionné ci-dessus du tissu fournit un extrait d'eau de HY contenant sensiblement moins de protéines qu'en l'absence d'un tel traitement.

5 La nature précise des évènements chimiques qui se produisent pendant le traitement du tissu n'est pas totalement connue et, par conséquent, l'invention ne doit pas être limitée par une quelconque réaction chimique spécifique. Il est estimé que, comme résultat des réactions chimiques entre les 10 protéines du tissu et un réactif présent dans le mélange de traitement, les protéines deviennent dénaturées et immobilisées dans les tissus et, par conséquent, sont insolubles dans l'extraction aqueuse subséquente.

15 Toute substance qui réagit avec les protéines dans un milieu contenant de l'eau peut être utilisée dans le but de la présente invention. On a constaté que la substance la plus avantageuse est le formaldéhyde. D'autres aldéhydes, tels que le glutaraldéhyde ou le glyoxal, peuvent être utilisés dans le procédé selon la présente invention.

20 Le traitement du tissu peut être effectué dans une solution aqueuse du réactif. Toutefois, si on procède ainsi, il se produira une perte substantielle de HY en raison de sa bonne solubilité dans l'eau. Pour cette raison, il est préférable d'effectuer le traitement du tissu dans un mélange 25 d'eau et d'un solvant organique miscible dans l'eau. Le solvant ne doit pas réagir avec le réactif utilisé pour l'immobilisation des protéines. Parmi ces solvants, on citera les cétones inférieures telles que l'acétone et la méthyle éthyle cétone, les alcools tels que l'éthanol ou l'isopropanol, les 30 solvants aprotiques tels que diméthylformamide, diméthylacétamide et diméthylsulfoxide, et autres. Quand un tel solvant est mélangé avec un tissu qui contient une grande quantité d'eau, habituellement 80-90 % ou plus en poids, on obtient un mélange eau- solvant. Le rapport eau- solvant dans le mélange peut être réglé à tout niveau désiré par modification du rapport solvant/tissu ou par addition d'eau au mélange. Le rapport eau/solvant préféré est déterminé par la solubilité de HY, en ce sens que HY ne doit pas être soluble dans le 35

mélange utilisé pour le traitement du tissu. La solubilité de HY dépend du type de solvant utilisé, du rapport eau/solvant., de la présence et de la concentration de tout électrolyte dans le mélange et du pH du mélange. La solubilité 5 de HY peut être sensiblement réduite en introduisant un électrolyte dans le mélange. On peut utiliser tout type d'électrolyte qui est soluble dans le mélange eau-solvant et qui fournit le pH désiré du mélange. Par exemple, quand on utilise de l'acétone comme solvant, on peut utiliser de manière 10 convenable l'acétate de sodium comme électrolyte soluble.

La composition du mélange pour traiter le tissu peut varier sur une large gamme selon la nature du tissu, le type de solvant utilisé, le type d'électrolyte, etc. Comme mentionné ci-dessus, le HY provenant du tissu ne doit pas être soluble dans le mélange de traitement mais ce dernier doit contenir suffisamment d'eau pour permettre au tissu de gonfler, de manière à faciliter la réaction entre le réactif et les polymères du tissu. On a constaté que dans le cas de crêtes-de-coq comme source de HY, la composition du mélange, 15 en prenant en compte l'eau provenant des crêtes, peut se situer dans la gamme suivante, en % en poids : eau 10-50, solvant 40-85, électrolyte 0-20, réactif 0,2-10. Plusieurs solvants différents peuvent être utilisés dans le même mélange de traitement, si on le désire. On a constaté qu'il 20 est avantageux d'utiliser de faibles quantités de solvants non miscibles dans l'eau, tels que le chloroforme, dans le mélange de traitement. La teneur de ces solvants dans le mélange peut se situer de 0,5 à 10 % en poids.

Le pH du mélange de traitement peut varier selon la 30 nature des réactifs, la composition du mélange, la température et la durée du traitement. Dans la récupération de HY à partir des tissus animaux, selon la présente invention, les considérations suivantes sont très importantes. Certains 35 des réactifs, par exemple le formaldéhyde, peuvent réagir avec les groupes hydroxyle des macromolécules d'acide hyaluronique à un faible pH pour donner un polymère réticulé insoluble dans l'eau. Un traitement prolongé dans un milieu présentant un pH relativement élevé conduit à la dégradation de

l'acide hyaluronique, et on ne peut récupérer qu'un polymère de faible poids moléculaire. On a constaté que, lorsqu'on utilise selon l'invention un réactif du type aldéhyde, on obtient les meilleurs résultats avec un pH voisin de 7, par 5 exemple dans la gamme de 4 à 10.

Le rapport du mélange de traitement au tissu peut varier sur une large gamme. La limite inférieure est habituellement déterminée par la condition que le tissu, qui occupe un grand volume dans le cas des crêtes-de-coq, doit au moins 10 être complètement recouvert par le mélange. La limite supérieure peut être choisie sur la base de considérations économiques. Dans le traitement des crêtes-de-coq selon la présente invention, le rapport du mélange de traitement au tissu, calculé sur le poids sec du tissu, est habituellement supérieur à 10/1. 15

La température affecte le rendement du traitement selon la présente invention. Toutefois, du fait que HY est susceptible d'hydrolyse à haute température, il est préférable d'effectuer le traitement à la température ambiante ou à une température inférieure pour obtenir un produit de poids moléculaire élevé. 20

La durée nécessaire pour effectuer le traitement dépend de nombreux facteurs, notamment la composition du mélange, la nature du tissu, la température, etc. On suppose que 25 le facteur de limitation dans le traitement réside dans la diffusion du réactif dans les tranches de tissu. Pour cette raison, la taille de ces tranches est un paramètre important. On a constaté que, dans le traitement de crêtes-de-coq découpées en tranches d'épaisseur 1-3mm, la durée du traitement 30 peut se situer dans la gamme de 4-24 heures.

Le tissu traité comme décrit ci-dessus est ensuite lavé avec un solvant ou un mélange solvant/eau pour éliminer du tissu le mélange de traitement en excès. Il est approprié d'utiliser le même solvant que celui qui est utilisé dans le 35 mélange pour le traitement du tissu. On peut procéder à un nombre quelconque de lavages, mais on a constaté qu'un lavage unique donne des résultats satisfaisants.

Le tissu lavé est ensuite directement extrait avec

l'eau pour la récupération de HY. On a constaté que l'efficacité de l'extraction dépend du rapport eau/tissu, du pH du milieu d'extraction, de la température et de la durée. On a également constaté que l'efficacité de l'extraction du tissu

5 traité peut être sensiblement augmentée d'abord en séchant le tissu traité pour éliminer le solvant qui a été utilisé dans le traitement et les étapes de lavage. On obtient les meilleurs résultats quand le tissu est séché de 1/4 à 1/2 de son poids original.

10 Le rapport eau/tissu dans la phase d'extraction est choisi sur la base de plusieurs considérations. Tout d'abord, il doit exister suffisamment de phase liquide pour recouvrir le tissu pendant l'extraction. Par ailleurs, la quantité d'eau ne doit pas être trop importante, de manière qu'on obtienne une concentration de HY dans l'extrait aussi élevée que possible pour réduire la quantité de précipitat dans l'étape suivante du procédé. On a constaté que, dans le cas de crêtes-de-coq, le rapport eau/tissu préféré est de 2 à 5, sur la base du poids des crêtes non traitées.

15 20 25 30 Le pH du milieu d'extraction peut être neutre, acide ou basique selon la qualité désirée du produit final. On a constaté que, pour obtenir un produit de poids moléculaire ultra élevé, le pH du milieu d'extraction doit se situer dans la gamme de 6-8,5. Un pH plus élevé conduit à une augmentation de la concentration de HY dans l'extrait mais, en même temps, à une diminution du poids moléculaire du produit et à des modifications dans les autres propriétés des polymères qui seront discutées ci-dessous avec plus de détails. Dans tous les cas, en commandant le pH pendant la phase d'extraction, on peut réguler de manière appropriée les propriétés du produit final dans une direction désirée.

35 Il est préférable d'extraire le tissu traité à une température inférieure à 25°C car la dégradation de HY à des températures plus élevées peut diminuer sensiblement le poids moléculaire du polymère.

La durée nécessaire pour extraire la quantité maximale de HY à partir du tissu traité varie sensiblement avec d'autres paramètres de l'extraction, notamment le pH, le rapport

liquide/tissu et l'intensité de l'agitation. On a constaté que, dans l'extraction de crêtes-de-coq avec de l'eau, on peut obtenir de bons résultats quand les crêtes traitées sont extraites sur une durée de 6 heures à plusieurs jours.

5 Le mélange du tissu traité et du milieu d'extraction peut être agité pendant l'extraction ou au contraire laissé au repos sans aucune agitation. De manière évidente, l'agitation augmente la vitesse de diffusion des molécules de HY à partir du tissu dans l'extrait. Par contre, une agitation 10 vigoureuse peut conduire à une dégradation de HY et, par conséquent, à une diminution du poids moléculaire. De plus, on a constaté qu'une agitation vigoureuse provoque une désintégration du tissu qui rend difficile la séparation du tissu par rapport à l'extrait. Par conséquent, il est préférable 15 d'effectuer la phase d'extraction sans agitation ou sous agitation très lente et douce.

Après l'extraction, le tissu est séparé de l'extrait en utilisant l'une quelconque de plusieurs méthodes conventionnelles, notamment la filtration, la centrifugation, la 20 décantation et analogue. On a constaté que la manière la plus simple et la plus économique était la filtration. Selon le genre de tissu utilisé comme matière de départ, il peut être préférable de procéder à une filtration en deux phases. Ainsi, dans le cas de crêtes-de-coq, de gros morceaux de tissu 25 peuvent être facilement séparés par filtration à travers un tamis en nylon et on peut obtenir une purification fine de l'extrait par filtration à travers tout milieu filtrant dense, par exemple une matière cellulosique.

La concentration de HY dans l'extrait dépend de nombreux 30 facteurs, notamment du pH pendant l'extraction, de la durée, du rapport liquide/tissu, et de l'intensité de l'agitation. D'habitude, la concentration se situe dans la gamme de 0,3 à 3,0 mg/ml et, parfois, même au-delà. Dans certains cas, quand la concentration de HY dans l'extrait se 35 situe dans les valeurs faibles, on a constaté qu'il était souhaitable de procéder à une seconde extraction du tissu. On a également constaté que le produit précipité à partir du second extrait présente habituellement un poids moléculaire

plus élevé par rapport à celui de HY provenant du premier extrait. Cela peut être expliqué par le fait que les fractions de HY qui présentent un poids moléculaire faible diffusent plus facilement du tissu dans l'extrait et par le fait 5 que le produit précipité à partir du premier extrait est enrichi avec ces fractions.

On peut utiliser plus de deux extractions pour obtenir un rendement aussi élevé que possible, mais la concentration de HY dans un extrait décroît avec chaque extraction consécutive. 10

On peut récupérer le HY à partir des filtrats par tout procédé connu de l'art antérieur. Le procédé le plus approprié est la précipitation avec un solvant miscible dans l'eau, par exemple de l'acétone, de l'éthanol, de l'isopropanol, etc. 15

La précipitation peut être faite en présence d'un acide, notamment hydrochlorique, sulfurique, phosphorique, etc, ou en présence d'électrolytes neutres, notamment l'acétate de sodium, le chlorure de sodium et leurs sels. Le HY et ses sels sont habituellement précipités sous la forme d'une matière blanche en 20 fibres ou sous la forme d'une poudre. Le précipitat peut être lavé avec le même solvant que celui qui est utilisé pour la précipitation, ou avec un quelconque autre mélange de solvants qui ne dissout pas le produit, par exemple de l'éther. Le produit lavé peut être séché par tout moyen approprié ou il peut 25 être stocké sous une couche d'un solvant, notamment de l'acétone, de l'éthanol, etc. En variante, le filtrat peut être séché et congelé.

Il est clair que toutes phases additionnelles de l'art antérieur et utilisées dans la purification de l'acide hyaluronique peuvent être introduites dans le procédé selon la présente invention sans sortir de son cadre. Par exemple, pour éliminer les agents créateurs de fièvre ou inflammatoires, on peut utiliser une extraction par des solvants bien connus, par exemple le chloroforme, dans lesquels le HY est insoluble mais 30 dans lesquels les lipoprotéines, les glycolipides ou les glycolipoprotéines sont solubles ou séparées.

Le procédé selon la présente invention permet d'obtenir des produits à base de HY dont les propriétés varient sur une large gamme. On a évalué les propriétés suivantes. Les pro- 35

cédés cités ont été utilisés pour caractériser les produits obtenus selon la présente invention.

La concentration de HY dans les solutions a été déterminée par des essais à l'acide hexuronique en utilisant le procédé automatisé au carbazole (E.A. Balazs, K.O Berntsen, J.Karossa et D.A. Swann, *Analyt. Biochem.* 12, 547-558 (1965)). La teneur en hexosamine a été déterminée par la méthode automatisée colorimétrique (D.A. Swan et E.A Balazs, *Biochem. Biophys. Acta* 130, 112-129 (1966)). La teneur en protéines des solutions de HY a été déterminée par le procédé au réactif phénol (Lowry et al. *J. Biol.Chem* 193, 265-275(1951)).

La teneur du produit en formaldéhyde a été déterminée par l'hydrolyse d'environ 0,1 g de l'échantillon dans 10 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 10 % pendant 2 heures avec ébullition, suivie par une distillation à la vapeur du formaldéhyde libre hors de la solution obtenue et la détermination du formaldéhyde dans le distillat en utilisant une méthode colorimétrique à l'acide chromotropique (M.J.Boyd et M.A. Logan, *J. Biol. Chem.*,146, 279 (1942)).

La valeur de viscosité limite (viscosité intrinsèque) est définie par la limite de $(n/n_0 - 1)/c$, n et n_0 étant les viscosités respectivement de la solution et du solvant et c étant la concentration de HY en g/cc. Les mesures ont été effectuées dans des solutions aqueuses de NaCl à 0,20 M dans un viscosimètre Ubbelohde de dilution du type à capillarité. Le poids moléculaire à viscosité moyenne est calculé par l'équation $[n] = 0,0228 M^{0,81}$ (R.C Cleland et J.L. Wang, *Biopolymers* 9, 799 (1970)).

Le poids moléculaire à poids moyen est déterminé par la méthode de diffusion de lumière laser à angle faible en utilisant un instrument Chromatix KMX-6 équipé d'un ensemble laser hélium-néon à 632,8 nm. Le poids moléculaire à poids moyen est également calculé à partir des constantes de sédiméntation et de diffusion déterminées dans une ultra-centrifugation analytique.

Le procédé dynamique de diffusion de la lumière est utilisé pour évaluer l'agrégation des molécules dans des solutions de HY relativement concentrées. Ce procédé donne la

distribution des diamètres sphériques équivalents (DSE)
dans la solution.

Les propriétés rhéologiques ont été évaluées avec le système de rhéomètre Bohlin qui est un rhéomètre à commande 5 par ordinateur pouvant fonctionner sur trois modes : viscométrie, oscillation et relaxation. Les paramètres suivants ont été mesurés pour la solution de HY : viscosité pour la large gamme de taux de cisaillement, viscosité dynamique, module de stockage dynamique et module de perte dynamique 10 pour diverses fréquences d'oscillation et divers temps de relaxation.

Comme mentionné ci-dessus, le produit selon la présente invention (HY) est un nouveau polymère qui est obtenu par réaction chimique *in situ* entre l'acide hyaluronique et un 15 agent de réticulation, par exemple le formaldéhyde. On a constaté, par analyse chimique de HY, que la teneur du formaldéhyde combiné dans des produits obtenus à partir des crêtes-de-coq traitées avec un mélange contenant du formaldéhyde, se situait dans la gamme de 0,005 à 0,02 % en poids, sur la base 20 du poids du polymère, selon les divers paramètres du traitement.

La présence du formaldéhyde combiné dans le produit a également été trouvée par une expérience dans laquelle le traitement a été effectué avec du formaldéhyde radioactif 25 $^{14}\text{CH}_2\text{O}$ (voir l'exemple 12 ci-dessous). Les résultats de l'expérience ont montré que le produit obtenu selon l'invention contenait du formaldéhyde combiné qui n'a pas pu être éliminé par des précipitations répétées ou par une dialyse exhaustive des solutions du polymère. Cela constitue une preuve très forte pour la démonstration de la liaison covalente du formaldéhyde avec les molécules polymères du produit. Pour déterminer si le formaldéhyde est spécifiquement combiné avec l'acide hyaluronique, ce dernier a été traité avec des hyaluronidases bactériennes ou de sangsue, enzymes dégradant spécifiquement 30 l'acide hyaluronique. Les résultats de ce traitement ont montré qu'une quantité appréciable de formaldéhyde était liée de manière covalente directement aux macromolécules de HY.

La teneur en protéines du produit obtenu selon la pré-

sente invention n'est habituellement pas supérieure à 0,5 %, sur la base du polymère sec, et elle peut atteindre 0,1 % et même moins.

La modification chimique de l'acide hyaluronique par 5 liaison covalente d'un agent de réticulation à ses macro-molécules, en d'autres termes les modifications dans la structure primaire du polymère, affectent sensiblement ses paramètres physico-chimiques, par exemple le poids moléculaire et la taille des molécules, l'interaction intermoléculaire et 10 les propriétés rhéologiques des solutions du polymère.

Le HY obtenu selon la présente invention peut avoir un poids moléculaire très élevé. Ainsi, la valeur de viscosité limite peut être supérieure à 7.000 cc/g, ce qui correspond à un poids moléculaire à viscosité moyenne d'environ 6×10^6 .

15 Le poids moléculaire à poids moyen, à partir des données de diffusion de la lumière, peut atteindre une valeur de 13×10^6 . On a constaté que cette discordance entre les poids moléculaires à poids moyen et à viscosité moyenne est très significative, comme discuté ci-dessous. Il doit être compris qu'un polymère présentant un poids moléculaire sensiblement inférieur, 20 par exemple 1×10^6 ou moins, peut facilement être obtenu avec le procédé selon la présente invention, si on le désire. De manière similaire, un polymère présentant tout poids moléculaire désiré peut être obtenu si le HY, à un quelconque stade 25 de sa récupération et de sa purification, est exposé à des agents qui sont connus pour rompre la liaison glucosidique de la chaîne polysaccharide. De tels agents bien connus sont des enzymes spécifiques, par exemple hyaluronidase, les systèmes de génération de radicaux libres, les forces de cisaillement, 30 la chaleur, les bases et les acides forts, etc.

Le volume partiel spécifique (vps) de HY dans la solution dépend de la force ionique de la solution. Il a été déterminé par densitométrie pour une solution de HY dans l'eau contenant 0,15 M de NaCl dans la gamme de concentration de 35 zéro à 0,5 mg/ml, et on a trouvé 0,627 cc/g.

La distribution de DSE pour un échantillon de HY dissous dans une solution à 0,15 M de NaCl dans une solution à 1 % est présentée à la FIG. 4. Il apparaît, à partir des don-

nées présentées, que HY existe sous une forme très hautement agrégée, bien que ces agrégats soient stables et ne sédimentent pas .

5 Les propriétés rhéologiques d'un produit typique de poids moléculaire ultra élevé, préparé selon la présente invention, sont présentées dans les FIGS. 1-3. On a constaté que ce produit forme des solutions (à 0,5 % en poids et au-delà) avec des propriétés viscoélastiques remarquables.

10 Les paramètres suivants caractérisent les propriétés élastiques des solutions du polymère de la meilleure manière: module de stockage dynamique (G'), la fréquence du "point de croisement" (point auquel le module G' de stockage dynamique devient supérieur au module G'' de perte dynamique), l'angle de phase et le temps de relaxation.

15 HY forme des solutions très visqueuses dans l'eau ou dans une solution aqueuse d'électrolytes. La viscosité de la solution dépend de la concentration du polymère, de la teneur en électrolyte, de la température, et elle décroît avec la vitesse de cisaillement, c'est-à-dire que les solutions de HY présentent une pseudo plasticité importante.

20 Si on considère les propriétés rhéologiques des solutions de HY, on peut comprendre que ces propriétés dépendent grandement du poids moléculaire du produit, comme dans le cas de tout autre polymère. On a mentionné ci-dessus qu' on peut 25 obtenir le HY présentant un poids moléculaire qui varie sur une large gamme et dont les propriétés rhéologiques varient de manière correspondante. Ainsi, on a constaté que, pour un produit de poids moléculaire ultra élevé (valeur de viscosité limite supérieure à 4500 cc/g), la viscosité d'une solution à 30 1 % en poids dans une solution aqueuse contenant 0,15 M de NaCl atteint 1000 Pa.s et même plus pour une vitesse de cisaillement de 0,055, alors qu'elle n'est que de 2 Pa.s pour une solution du polymère à 1 % en poids avec une valeur de viscosité limite d'environ 1000 cc/g. On a constaté que 35 les propriétés élastiques des solutions de HY dépendent également du poids moléculaire du polymère. Ainsi, le module G' de stockage dynamique pour une solution à 1 % en poids de HY d'un poids moléculaire ultra élevé dans une solution contenant

0,15 M de NaCl est d'environ 40 Pa à une fréquence de 0,01 Hz, tandis qu'il n'est que d'environ 0,2 Pa pour une solution de HY avec une valeur de viscosité limite d'environ 1000 cc/g . La fréquence du "point de croisement", qui caractérise de très bonne manière le rapport entre les propriétés élastiques et visqueuses des solutions du polymère, est habituellement inférieure à 0,025 Hz pour des solutions de HY à 1 % en poids dans des solutions contenant 0,15 M de NaCl, à 25° C, quand le poids moléculaire du polymère se situe dans la gamme d'environ $1,5 \times 10^6$ à 8×10^6 et au-delà.

Les propriétés physico-chimiques et rhéologiques d'un échantillon de HY et de sa solution ont été comparées avec les mêmes propriétés d'un produit à base d'acide hyaluronique obtenu selon un procédé bien connu, et elles sont présentées dans le tableau I et montrées dans les FIGS. 4 et 5. Le produit utilisé pour la comparaison est de l'acide hyaluronique récupéré à partir de crêtes-de-coq par extraction aqueuse suivie d'une déprotéinisation avec la méthode dite Sevag, qui comporte plusieurs extractions au chloroforme (G.Blix, O.Shellman, Arkiv for Kemi, Mineral Geol. 19A,1 (1945)).

25

30

35

TABLEAU 1

DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES ET RHEOLOGIQUES
COMPAREES POUR DES ECHANTILLONS DE HY ET
D'ACIDE HYALURONIQUE

<u>Paramètres</u>	<u>HY</u>	<u>ACIDE HYALURONIQUE</u>
5 Valeur de viscosité limite(cc/g)	4.729	3.562
Poids moléculaire à partir des données de viscométrie (X 10 ⁶)	3,28	2,30
10 Poids moléculaire à partir des données de diffusion de la lumière (X 10 ⁶)	13,30	2,86
Poids moléculaire à partir des données de sédimentation de diffusion (X 10 ⁶ PSU)	13,60	2,14
15 Volume spécifique partiel (cc/g)	0,627	0,570
Propriétés rhéologiques d'une solution à 1% dans une solution contenant 0,15 M de NaCl : Viscosité de cisaillement à une vitesse de cisaillement de 0,055 ⁻¹ ,(Pa.s)	969	305
20 Module de stockage dynamique (G')	39,8	10,1
à une fréquence de 0,01 Hz (Pa)		
Fréquence au "point de croisement" (Hz)	0,0056	0,035
25 Temps de relaxation pour réduire de moitié le module	58	19
Angle de phase (°)		
à la fréquence de 0,002 Hz	58,7	76
à la fréquence de 10 Hz	8,5	12
30 Les données présentées dans le Tableau 1 et dans la FIG 4 montrent des différences notables entre HY et l'acide hyaluronique. Tout d'abord, le poids moléculaire à viscosité moyenne et le poids moléculaire à poids moyen pour le produit connu étaient sensiblement les mêmes (le poids moléculaire à poids moyen est légèrement inférieur), tandis que, pour le produit selon la présente invention, le poids moléculaire à poids moyen est environ quatre fois supérieur au		
35		

5 poids moléculaire à viscosité moyenne. En second lieu, la valeur supérieure de vsp pour la solution de HY, par comparaison avec la solution d'acide hyaluronique, prouve que les macromolécules de HY présentent une plus grande taille. En
10 5 troisième lieu, l'agrégation des macromolécules de HY dans la solution donne naissance à des agrégats sensiblement plus importants que ceux des solutions d'acide hyaluronique, ce qui suggère non seulement une plus grande taille pour les macromolécules de HY, mais également une interaction inter-
15 moléculaire beaucoup plus forte. Enfin, les solutions de HY sont sensiblement plus visqueuses et élastiques que les solutions équiconcentrées d'acide hyaluronique. Bien que la viscosité accrue puisse être attribuée à un poids moléculaire plus important à viscosité moyenne, la forte augmentation ob-
20 servée de l'élasticité peut difficilement être expliquée par la même raison.

25 Toutes ces observations conduisent à la conclusion que la modification chimique de l'acide hyaluronique *in situ* avant son extraction du tissu, bien qu'elle provoque seulement des variations mineures dans la composition chimique du polymère, entraîne en même temps des modifications très importantes des paramètres physico-chimiques et des propriétés rhéologiques. Cela ne peut se produire que lorsque la modification dans la composition chimique correspond à des modifications majeures dans la structure macromoléculaire.

30 La forme et la conformation des macromolécules d'acide hyaluronique en solution ont été étudiées par diverses méthodes, et il existe une littérature abondante à ce sujet. Ces études indiquent que les macromolécules présentent une configuration aléatoire augmentée en colimaçon et s'enchevêtrent les unes avec les autres pour une concentration relativement faible (par exemple 0,1 %) du polymère dans la solution. Pour des concentrations plus importantes, on pense que la solution contient un réseau continu tridimensionnel de chaînes polymères. On a trouvé que les liaisons glucosidiques dans les macromolécules d'acide hyaluronique possèdent une force considérable. On a proposé plusieurs mécanismes, par exemple l'interaction solvant-soluté, l'interaction avec de faibles quan-

tités de protéines présentes dans de nombreuses préparations d'acide hyaluronique , et les interactions inter-chaînes, pour expliquer ces phénomènes (voir par exemple E.A.Balazs, Physical Chemistry of Hyaluronic Acid, Fed. Proceed., 17, 5 1086-1093 (1958)). Certains auteurs ont proposé une double structure hélicoïdale pour les macromolécules d'acide hyaluronique et ont suggéré que les doubles segments hélicoïdaux pouvaient jouer le rôle d'agents de réticulation fournissant les propriétés rhéologiques inhabituelles des solutions d'acide hyaluronique (C.M. Dea, R. Moorhous, D.D.Rees, S. Arhott, J.M. Guss et E.A. Balazs, Science, 179, 560-562 (1972) ; S. Arnott, A.R. Mitra et S. Raghunatan, J. Mol. Biol. 169, 861-872 (1983)).

En prenant en considération ces études et ces observations, on est parvenu à l'hypothèse que le produit HY selon la présente invention peut contenir un nombre additionnel de liaisons de réticulation introduites pendant le traitement du tissu avec un agent d'immobilisation de réticulation des protéines. Les agents utilisés selon la présente invention, par exemple le formaldéhyde, sont très actifs à l'égard de divers groupes chimiques, leur réactivité dépendant sensiblement des conditions de réaction telles que le pH, la température, la concentration, etc. Les groupes hydroxyles de l'acide hyaluronique ne réagissent à l'évidence pas avec ces agents dans les conditions de traitement car le produit obtenu après le traitement est toujours soluble dans l'eau et, par conséquent, ne présente pas un degré substantiel de polymère réticulé. La quantité de liaisons additionnelles de réticulation introduites dans le polymère pendant le traitement est probablement assez faible pour ne pas provoquer l'insolubilité du polymère, mais suffisamment importante pour augmenter de manière notable l'interaction entre les macromolécules, et par conséquent l'élasticité de la solution du polymère. Plusieurs candidats pour une telle réaction avec l'agent de traitement sont des groupes acétamido de l'acide hyaluronique, les groupes amino nonacétylés qui peuvent être présents en faibles quantités dans l'acide hyaluronique, et les groupes amido et amino, et les autres grou-

pes réactifs, de protéines qui sont présents dans la matrice intercellulaire du tissu pendant le traitement. Il est peu probable que les groupes acétamido de l'acide hyaluronique eux-mêmes puissent fournir une réticulation intermoléculaire. Dans les études de la réaction de protéines avec le formaldéhyde (voir par exemple J.F. Walker, *Formaldéhyde, Reinhold Publ.Corp.*, NY, 1953, pp 312-317), on a constaté que les groupes amide d'une protéine ne pouvaient pas eux-mêmes fournir la réticulation, et l'une des réactions les plus probables dans la formation des liaisons de réticulation est la réaction du formaldéhyde avec les groupes amino qui donne les groupes N-méthylol amino, lesquels réagissent à leur tour avec les groupes amide.

Par suite, deux mécanismes sont possibles pour introduire un nombre limité de liaisons de réticulation dans les macromolécules d'acide hyaluronique. Le premier mécanisme comporte la réaction entre un agent de réticulation, par exemple le formaldéhyde, et les groupes acétamido et non-amino d'acide hyaluronique, dont l'existence est très probable dans l'acide hyaluronique (E.A. Balazs, *Fed. Proceed.* 25, 1817-1822 (1966)).

Le second mécanisme possible suggère la participation des protéines ou des polypeptides dans la réaction de réticulation. On maintient dans la littérature que les protéines ou les polypeptides sont liées de manière covalente à la molécule d'acide hyaluronique (Yuko Mikum-Takagaki et B.P. Toole, *J.Biol.Chem.* 256 (16), 8463-8469 (1981)) ou qu'elles peuvent être associées d'une autre manière avec les molécules d'acide hyaluronique. Dans ce cas, des liaisons de réticulation peuvent se former entre une macromolécule d'acide hyaluronique et une partie des protéines et une autre macromolécule d'acide hyaluronique, ou entre une protéine liée de manière covalente à deux macromolécules d'acide hyaluronique.

Aucun de ces mécanismes ne doit être considéré comme limitatif de la présente invention. Il doit être compris que d'autres mécanismes pour l'introduction de faibles quantités de liaisons covalentes de réticulation dans le produit selon

la présente invention sont possibles.

Dans tous les cas, la caractéristique essentielle de la présente invention réside dans la modification chimique de l'acide hyaluronique dans le tissu pendant son processus de récupération, probablement par l'introduction d'un faible nombre de liaisons de réticulation dans les macromolécules d'acide hyaluronique, le degré de modification étant suffisant pour augmenter sensiblement les caractéristiques élastiques des solutions du polymère sans aucun effet néfaste sur les propriétés bénéfiques de l'acide hyaluronique, notamment quant à sa capacité de donner des solutions hautement visqueuses dans un milieu aqueux, sa biocompatibilité, etc.

L'acide hyaluronique chimiquement modifié (HY), préparé selon la présente invention, peut être utilisé avec succès pour de nombreuses applications dans le domaine biomédical et dans le domaine des cosmétiques, par exemple comme un outil en viscochirurgie, pour des revêtements améliorant la biocompatibilité de diverses matières, comme constituant de diverses préparations pharmaceutiques, dans des produits de soin de la peau, etc. Les propriétés améliorées de ce polymère, par exemple une élasticité accrue, donnent des avantages significatifs quand on utilise HY.

HY peut également être utilisé comme matière de départ pour de nouveaux produits obtenus par modification chimique additionnelle, par exemple la réticulation avec des agents conventionnels de réticulation. On a constaté que les propriétés spéciales de l'acide hyaluronique chimiquement modifié selon la présente invention et ses solutions donnent une occasion d'obtenir les produits ci-dessus modifiés de manière additionnelle, lesquels possèdent également certaines propriétés non habituelles. Ainsi, on a constaté qu'on peut obtenir, à partir du produit selon l'invention, une matière insoluble dans l'eau et du type gelée, par réticulation avec du sulfone de divinyle dans une solution alcaline. Cette matière est un gel hautement gonflé. La concentration du polymère dans le gel dépend de la composition de la phase liquide qui peut être de l'eau ou des solutions aqueuses de diverses substances de faible poids moléculaire, par exemple

les électrolytes. Dans le cas d'une solution de sel physiologique (0,15 M de NaCl dans l'eau), la concentration du polymère peut se situer dans la gamme de 0,15 à 0,40 % en poids. Cette matière possède des propriétés rhéologiques très intéressantes (FIGS. 5,6 et 7). Ainsi, la composante élastique du module dynamique complexe (G') est supérieure au module de perte (G'') pour toutes les fréquences essayées. En même temps, la matière se comporte comme un corps pseudo-plastique à des faibles vitesses de cisaillement, c'est-à-dire qu'elle présente une viscosité substantielle qui diminue avec la vitesse de cisaillement. Cette matière est également caractérisée par un temps très long de relaxation. On croit fermement que cela constitue une structure unique des solutions de HY obtenues selon la présente invention, ce qui rend possible l'obtention du produit ci-dessus du type gelée présentant ces propriétés rhéologiques spéciales. En d'autres termes, les modifications chimiques dans l'acide hyaluronique, qui se produisent pendant le procédé de récupération selon la présente invention, affectent non seulement la structure et les propriétés de HY, mais également les propriétés des produits obtenus à partir de celui-ci. Par suite, on a constaté que, lorsque l'acide hyaluronique obtenu selon les méthodes continues de l'art antérieur, c'est-à-dire par l'élimination des protéines au moyen d'extractions au chloroforme, était utilisé comme matière de départ pour la réticulation avec du sulfone de divinyle, on obtenait une matière insoluble qui présentait des propriétés rhéologiques sensiblement moins bonnes que celles du produit selon la présente invention.

Bien entendu, de nombreuses autres matières modifiées peuvent être obtenues par modification additionnelle du produit obtenu selon la présente invention, par exemple des gels fortement réticulés, des pellicules insolubles, des revêtements, etc.

Les exemples suivants illustrent des modes de mise en oeuvre préférés de l'invention, sans en constituer pour autant une limitation.

EXEMPLE 1

On a lavé de manière intensive des crêtes-de-coq

avec une solution aqueuse à 1 % de chlorure de cétylpyridinium, puis avec de l'eau déionisée et, finalement, on les a congelées. Les crêtes congelées ont été découpées en tranches d'environ 1-2 mm d'épaisseur. On a préparé un mélange 5 contenant 1000 g d'acétone, 100g de formaline à 37% et 50g d'acétate de sodium, et on a ajouté 1000g des crêtes au mélange. Le mélange des crêtes et du liquide de traitement (pH6,7) a été maintenu pendant 24 heures à une température d'environ 20°C sous faible agitation. Le liquide a ensuite été séparé des 10 crêtes par filtration à travers un tamis en nylon. Les crêtes traitées ont ensuite été lavées avec 500 g d'acétone et séchées à l'air pour donner un poids final de 500 g. Les crêtes séchées ont été mélangées avec 2,5 l d'eau déionisée et l'extraction a été effectuée pendant 72 heures à une température 15 d'environ 20°C sous faible agitation. Les crêtes ont été séparées de l'extrait par filtration à travers un tamis en tissu de nylon, et l'extrait a été encore filtré à travers une matière filtrante du type cellulosique ("Micro-media" R, M70, Ertel Engineering Co.). La concentration d'acide hyaluronique 20 dans ce premier extrait a été de 0,92 mg/ml. On a mélangé 2 l de l'extrait avec 4 l d'acétone et 20 g d'acétate de sodium. Il s'est formé un précipitat fibreux blanc qui a été collecté, lavé avec de l'acétone et séché dans un four à vide à 35° C. On a obtenu 1,75 g de produit. Le rapport hexosamine/ 25 acide hexuronique pour le produit a été de 1 + 0,05. La teneur en formaldéhyde dans le produit a été de 0,0150 %. Ainsi, le produit a été identifié comme Hylan. La teneur en protéines dans le produit a été de 0,35 % et la valeur de viscosité limite a été de 4,320 cc/g.

30 Après la première extraction, les crêtes ont été mélangées avec 2,5 l d'eau déionisée, et l'extraction a été effectuée pendant 48 heures à la température ambiante. Les crêtes ont été séparées et l'extrait a été filtré comme indiqué ci-dessus. La concentration d'acide hyaluronique dans le second 35 extrait a été de 0,65 mg/ml. On a récupéré 1,26 g du produit à partir de l'extrait par précipitation, comme décrit ci-dessus. Cette fraction se caractérisait également comme un hyaluronate de sodium chimiquement modifié avec une teneur en for-

5 maldéhyde de 0,014 %. La teneur en protéines a été de 0,27% et la valeur de viscosité limite a été de 4.729 cc/g. Les propriétés réhologiques d'une solution à 1 % en poids dans une solution aqueuse contenant 0,15 M de NaCl dans l'eau ont été évaluées. Ces données sont données dans le Tableau 1.

10 On a également effectué une troisième extraction aqueuse des crêtes, comme indiqué ci-dessus. La concentration en acide hyaluronique dans le troisième extrait a été de 0,33mg/ml, et on a récupéré 0,60 g d'acide hyaluronique à partir de cet extrait, avec une teneur en protéines de 0,20 %, une valeur de viscosité limite de 4.830 cc/g et une teneur en formaldéhyde de 0,0115 %.

15 Ainsi, on a récupéré à partir de 1 kg de crêtes-de-coq 3,61 g de hyaluronate de sodium chimiquement modifié.

15 EXEMPLE 2

20 On a mélangé 1 kg de crêtes-de-coq en tranches, préparées comme dans l'Exemple 1, avec un mélange de 1 kg d'acéto-
ne et de 150 g d'une solution à 40 % en poids de glutaraldé-
hyde dans l'eau. Le pH de ce mélange était de 6,9. Le mélan-
ge a été maintenu pendant 16 heures à la température ambiante,
25 à environ 20° C sous faible agitation (environ 1 tour/
minute). Ensuite, les crêtes ont été séparées du liquide, lavées à l'acétone et séchées à l'air pour donner la moitié de leur poids original. Les crêtes séchées ont été extraites
avec 3 l d'eau déionisée pendant 96 heures à une température
d'environ 20° C. L'extrait a été séparé des crêtes et filtré
comme décrit dans l'Exemple 1. La teneur en acide hyaluronique
30 dans l'extrait a été de 1,4 mg/ml. Le produit, après précipi-
tation avec l'acétone conformément à l'Exemple 1, a pré-
senté une teneur en protéines de 0,42 % et une valeur de vis-
cosité limite de 3.700 cc/g.

EXEMPLE 3

35 On a répété le processus décrit à l'Exemple 2, à la différence que la même quantité d'une solution à 40 % en poids de glyoxal dans l'eau a été utilisée au lieu d'une solution de glutaraldéhyde. La concentration d'acide hyaluronique dans l'extrait a été de 0,92 mg/ml. La teneur en protéines dans le produit a été de 0,5 % et la valeur de viscosité limite

a été de 3.930 cc/g.

EXEMPLE 4

Des crêtes-de-coq ont été lavées, congelées, tranchées et traitées avec le mélange acétone-formaldéhyde conformément à l'Exemple 1. Les crêtes, après avoir été séchées pour donner la moitié de leur poids original, ont été extraites avec 2,5 l d'une solution aqueuse à 0,05 M d'hydroxyde de sodium (pH supérieur à 11) pendant 120 heures à une température d'environ 20° C. L'extrait a été séparé et filtré comme décrit dans l'Exemple 1. La concentration d'acide hyaluronique dans l'extrait a été de 3,6 mg/ml. Un produit blanc a été précipité avec un mélange acétone-acétate de sodium, lavé avec de l'acétone et séché. On a obtenu 7,5 g d'un produit présentant une teneur en protéines de 0,2 % et une valeur de viscosité limite de 1.310 cc/g.

EXEMPLE 5

Des crêtes-de-coq ont été lavées, congelées et tranchées, et 1 kg de crêtes ont été mélangées avec un mélange contenant 1 kg d'isopropanol, 100 g de formaline à 37 %, 20 50 g d'acétate de sodium et 100 g de chloroforme. Le traitement a été effectué sous faible agitation pendant 16 heures à une température d'environ 20° C. L'extraction et la précipitation ont été effectuées comme décrit dans l'Exemple 1. La concentration de l'extrait en acide hyaluronique a été de 25 0,68 mg/ml. La teneur du produit en protéines a été de 0,46 % et la valeur de viscosité limite de 4.900 cc/g.

EXEMPLE 6

Des crêtes-de-coq ont été lavées, congelées, tranchées, traitées avec un mélange acétone-formaldéhyde, lavées à l'acétone, séchées et extraites avec de l'eau, comme décrit dans l'Exemple 1. L'extrait a été mélangé avec un mélange de 30 2 l d'acétone et de 1 l de chloroforme. On a obtenu 1,9 g d'un produit blanc en fibres présentant une teneur en protéines de 0,05 % et une valeur de viscosité limite de 4.400 cc/35 g.

EXEMPLE 7

On a traité 1 kg de crêtes en tranches préparées comme décrit dans l'Exemple 1 avec un mélange contenant 1 kg

d'acétone, 50 g de formaline à 37 % et 50 g d'acétate de sodium pendant 24 heures à une température d'environ 20°C sous faible agitation. L'extrait a été séparé et filtré et le produit a été précipité comme décrit dans l'Exemple 1. On a obtenu 1,6 g de produit blanc présentant une teneur en protéines de 0,45 %, une valeur de viscosité limite de 5.300 cc/g et une teneur combinée en formaldéhyde de 0,008 %.

EXEMPLE 8

Le processus décrit dans l'Exemple 1 a été répété à la différence que, après le traitement à l'acétone-formaldéhyde, les crêtes ont été séchées pour donner un tiers de leur poids original, et la première extraction à l'eau a été effectuée pendant 96 heures.

La concentration en acide hyaluronique dans le premier extrait a été de 1,05 mg/ml. Le produit précipité à partir de l'extrait présentait une teneur en protéines de 0,25 % et une valeur de viscosité limite de 4.930 cc/g. Un test d'oscillation d'une solution à 1 % en poids de ce produit dans une solution aqueuse contenant 0,15 M de NaCl a donné un "point de croisement" à une fréquence de 0,020 Hz.

La concentration en acide hyaluronique dans le second extrait a été de 0,58 mg/ml. La fraction obtenue à partir de cet extrait a présenté une teneur en protéines de 0,19 % et une valeur de viscosité limite de 7.300 cc/g. La teneur combinée en formaldéhyde a été de 0,01 %. La fréquence du "point de croisement" dans le test d'oscillation a été de 0,0005 Hz.

Au total, on a récupéré avec les trois extractions consécutives 3,5 g d'acide hyaluronique chimiquement modifié.

EXEMPLE 9

Des crêtes-de-coq ont été lavées, congelées et tranchées, et 1 kg de tranches a été mélangé avec 1 kg d'acétone, 200 g de formaline à 37 % et 100 g de chloroforme. Le pH du mélange a été réglé à 4,0 avec de l'acide hydrochlorique. La concentration en acide hyaluronique dans le premier extrait a été de 0,58 mg/ml. Le produit a été récupéré à partir du premier extrait par précipitation avec de l'acétone et de l'acétate de sodium conformément à l'Exemple 1. La teneur

en protéines dans le produit a été de 0,12 % et la valeur de viscosité limite a été de 4.025 cc/g. La teneur combinée en formaldéhyde dans le produit a été de 0,02 %. La fréquence du "point de croisement" dans le test d'oscillation pour une solution à 1 % en poids du produit dans une solution aqueuse contenant 0,15 M de NaCl a été de 0,006 Hz.

EXEMPLE 10

Des crêtes-de-coq ont été lavées, congelées et tranchées, et 1 kg de tranches a été traité avec un mélange acétone-formaldéhyde comme décrit dans l'Exemple 1, à la différence que le pH du mélange a été réglé à 11,0 avec de l'hydroxyde de sodium. Les crêtes ont été séchées et extraites à l'eau conformément à l'Exemple 1. La concentration d'acide hyaluronique dans l'extrait a été de 0,69 mg/ml. Le produit a été précipité à partir de l'extrait conformément à l'Exemple 1, à la différence qu'on a utilisé de l'isopropanol à la place de l'acétone. On a obtenu 1,3 g de matières fibreuses blanches présentant une teneur en protéines de 0,45 %, une valeur de viscosité limite de 5.050 cc/g et une teneur en formaldéhyde de 0,012 %. La fréquence du "point de croisement" dans le test d'oscillation pour une solution à 1 % du produit dans une solution aqueuse contenant 0,15 M de NaCl a été de 0,012 Hz.

EXEMPLE 11

Cet Exemple illustre l'obtention d'une matière du type gelée à partir de HY. On a mélangé 0,88 g du produit précipité à partir du second extrait de l'Exemple 1 avec 28,3 g d'une solution aqueuse contenant 0,05 N de NaOH, et le mélange a été agité pendant 60 minutes à la température ambiante. On a ajouté à la solution visqueuse qui a été obtenue un mélange de 0,26 g de sulfone de divinyle et 1,0 g d'une solution aqueuse contenant 0,5 n de NaOH. Le mélange résultant a été agité pendant 10 minutes puis laissé au repos pendant 50 minutes à la température ambiante. On a obtenu un gel élastique, incolore et clair. Le gel a été placé dans 0,5 l d'une solution saline à 0,15 M et laissé au repos toute la nuit. Ensuite, le liquide en excès a été éliminé du gel hautement gonflé et on a ajouté au gel 0,5 l de solution saline

fraîche, puis le mélange a été agité pendant 24 heures. Le liquide en excès a été décanté à partir de la matière gonflée insoluble. On a obtenu une matière claire du type gelée. On a déterminé la concentration de l'acide hyaluronique dans 5 le produit à 0,275 % en poids. Les propriétés rhéologiques de la matière sont illustrées aux FIGS. 5, 6 et 7.

EXEMPLE 12

Traitemen^tt de crêtes-de-coq avec $^{14}\text{CH}_2\text{O}$

Du paraformaldéhyde radioactifé ($^{14}\text{CH}_2\text{O}$), présentant 10 une activité spécifique de 500 m Ci/g (produits chimiques radioactifs I2CN) a été mélangé dans une quantité correspondant à 5,0 mCi avec 1,0 ml d'une solution à 37 % en poids de formaldéhyde dans l'eau, puis on a ajouté 0,1 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 1 N. Le mélange a été placé 15 dans un récipient hermétiquement fermé et chauffé à 60° C pour dissoudre le paraformaldéhyde. Ensuite, le mélange a été refroidi à 0° C et neutralisé avec 0,1 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 1 N. La radioactivité de la solution obtenue a été mesurée dans 10 ml d'un milieu liquide 20 Hydrofluor ^R de comptage de scintillation (National Diagnostic) en utilisant un compteur Searle Isocap 300 de scintillation du liquide, avec une correction d'efficacité par ordinateur, sur la base d'une méthode externe standard. La concentration en formaldéhyde a été déterminée par une méthode 25 colorimétrique en utilisant de l'acide chromotropique. L'activité spécifique mesurée de la solution obtenue a été de 0,555 mCi/mmol de CH_2O . La solution de formaldéhyde a été mélangée avec 7,5 g d'acétone, 1 g de chloroforme et 0,5 g d'acétate de sodium. On a mélangé 7,5 g de crêtes-de-coq en 30 tranches avec la solution, et le traitement a été effectué pendant 18 heures à une température d'environ 20° C. Les crêtes ont été séparées du liquide, lavées plusieurs fois à l'acétone et séchées à l'air pour donner la moitié de leur poids d'origine. On a ajouté 15 ml d'eau distillée deux fois aux 35 crêtes, et l'extraction a été effectuée pendant 96 heures à une température d'environ 20° C. L'extrait a été séparé des crêtes et filtré à travers plusieurs couches de papier filtre (Whatman R numéro 1). Le même processus a été répété pour ob-

tenir un second extrait des crêtes. Le HY a été précipité à partir des extraits sous la forme d'une matière blanche en fibres par addition aux extraits de CH_3OONa dans une quantité donnant une solution à 1 % en poids et 4 volumes d'éthan 5 nol à 95 %. La matière en fibres a été séparée, lavée intensivement à l'acétone, séchée puis redissoute dans l'eau pour donner une solution présentant une concentration en HY d'environ 1 mg/ml. Le HY a été reprécipité à partir de cette solution, comme décrit ci-dessus, et à nouveau lavé intensivement 10 à l'acétone puis séché. La matière sèche a de nouveau été redissoute dans de l'eau distillée pour donner une solution contenant 0,84 mg/ml de HY. L'activité spécifique de cette solution a été mesurée comme donnant 194 dpm/ μg d'acide hyaluronique. Une dialyse exhaustive de cette solution contre 15 un tampon de phosphate à 0,05 M, pH 7,5, contenant 0,15 M de NaCl, a réduit la radioactivité à 103 dpm/ μg de HY. Une dialyse exhaustive de cette solution contre de l'hydrochlorure de guanidium à 4 M a réduit l'activité à 101 dpm/ μg de HY, ce qui indique que du formaldéhyde est resté dans le produit 20 même après le traitement de la solution dans les conditions de dissociation des protéines. Sur la base de cette radioactivité mesurée du produit et de l'activité spécifique de la solution de formaldéhyde de départ, la teneur en formaldéhyde par rapport à HY a été calculée à environ 0,2 % en poids. 25 Pour évaluer dans quelle mesure le formaldéhyde radioactif s'est associé avec le HY susceptible d'une dégradation enzymatique avec un hyaluronidase Streptomyces, on a préparé une autre solution du produit qui contenait 0,8 mg/ml de HY et présentait une activité de 1.250 dpm/10 μl de solution. On a ajouté à 2 ml de cette solution 0,1 ml d'un tampon citrate-phosphate (pH 5,6) contenant 33 TRU de hyaluronidase Streptomyces (Miles Laboratories, Inc., activité spécifique 2.000 TRU/mg d'acide hyaluronique, activité protéolytique inférieure à 5×10^{14} unités par TRU). On a ajouté à une autre fraction de 2 ml de la même solution 0,1 ml du tampon sans l'enzyme. Les deux parties ont été dialysées pendant 24 heures contre 1000 volumes du tampon citrate-phosphate. Les volumes 30 des deux échantillons ont été les mêmes après dialyse. L'é- 35

chantillon non traité à l'enzyme a présenté une concentration en HY de 0,76 mg/ml et une radioactivité de 552 dpm/10 μ l . La concentration en HY dans l'échantillon traité à l'enzyme se situait sous un niveau détectable (10 μ g/ml) et la radioactivité a été de 414dpm /10 μ l de solution. Ainsi, le 5 hyaluronidase susceptible de radioactivité correspondait à 20 dpm/ μ g de HY, ce qui correspond à 0,049 % en poids de formaldéhyde associé avec le HY digestible de manière enzymatique. De tels échantillons du produit ont encore été analysés par chromatographie à pénétration de gel sur une colonne 10 en verre de 1,6 X 90 cm garnie de clycryle CPG 3000, taille des pores $2869 \pm 8,3$ % (Electronucleonics, Inc.). Un tampon de borate à 0,02 M dégazé (pH 7,5), contenant 0,15 M de NaCl, a été utilisé pour l'élution. Le volume exclu de la 15 colonne (Vo) a été déterminé avec un échantillon de HY de poids moléculaire 4×10^6 , et le volume total de la colonne (Vt) a été déterminé avec du sucre. L'élution a été effectuée à un faible débit de 10 ml/h à 6° C. On a recueilli des fractions de 5 ml et on les a analysées pour la concentration 20 et la radioactivité de HY. On a constaté que la radioactivité coélue avec le HY dans le volume vide, et que la digestion enzymatique élimine des fractions de volume vide à la fois le HY et la radioactivité. Le calcul a montré que l'activité spécifique associée au HY de volume vide a été de 14,6 dpm/ 25 μ g de HY , ce qui correspond à 0,036 % en poids de formaldéhyde dans le polymère. Cette valeur est une confirmation de celle qui a été obtenue dans l'expérience de dialyse. Bien entendu, l'invention n'est pas limitée au mode de réalisation, non plus qu'au mode d'application, qui ont été décrits ; on 30 pourrait au contraire concevoir diverses variantes sans sortir pour autant de son cadre.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention d'une préparation d'acide hyaluronique chimiquement modifiée, caractérisé par le fait qu'il comporte les étapes consistant à :

5 (a) traiter un tissu animal contenant de l'acide hyaluronique avec un mélange aqueux de traitement contenant une substance réagissant avec les protéines et l'acide hyaluronique pour effectuer *in situ* une modification chimique de l'acide hyaluronique contenu dans le tissu,

10 (b) enlever le mélange de traitement en excès du mélange de réaction,

(c) extraire à l'eau l'acide hyaluronique chimiquement modifié du tissu animal traité,

15 (d) séparer l'extrait contenant l'acide hyaluronique modifié du tissu animal traité, et

(e) récupérer de l'extrait l'acide hyaluronique chimiquement modifié.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la substance réagissant avec les protéines et l'acide hyaluronique contenu dans le mélange aqueux de traitement est un aldéhyde, par exemple du formaldéhyde, du glutaraldéhyde ou du glyoxal.

25 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que le mélange aqueux de traitement contient un solvant, par exemple une cétone inférieure, un alcool inférieur ou un solvant aprotique tels que l'acétone, la cétone méthyle-éthyle, l'éthanol, l'isopropanol, le diméthyle formamide, le diméthyle acétamide ou le diméthyle sulfoxide, qui ne réagit pas avec l'aldéhyde.

30 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que le mélange aqueux de traitement peut comporter un électrolyte, notamment de l'acétate de sodium, et un solvant organique insoluble dans l'eau, par exemple du chloroforme.

35 5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé par le fait que le rapport pondéral de l'eau au solvant miscible dans l'eau dans le mélange de traitement est de 1-5/4-8,5, et que le rapport pondéral de l'eau à l'aldéhyde est

de 1-5/0,02-1.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que le mélange de traitement comporte, en parties, en poids :

5	eau	10-50
	solvant miscible dans l'eau	40-85
	aldéhyde	0,2-10
	solvant insoluble dans l'eau	0,5-10
	électrolyte	0-20

10 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que le mélange de traitement présente un pH de 4-10, le rapport pondéral du mélange de traitement au tissu à traiter est d'au moins 10/1, et en ce que le traitement est effectué pendant environ 4-24 heures à la température ambiante ou à une température inférieure.

15 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que le tissu animal est constitué par des crêtes-de-coq et que les crêtes sont coupées en tranches d'environ 1-3 mm d'épaisseur.

20 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé par le fait que le mélange de traitement est éliminé du mélange de réaction par lavage du tissu traité avec un solvant ou un mélange solvant/eau, le solvant utilisé pour le lavage pouvant être le même que celui qui est utilisé dans le mélange de traitement.

25 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé par le fait que l'extraction de l'acide hyaluronique chimiquement modifié est effectuée à une température inférieure à 25° C pendant environ 6 heures à plusieurs jours, le rapport pondéral de l'eau au tissu traité étant d'environ 2-5/1, sur la base du poids du tissu non traité.

30 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé par le fait que le tissu traité est séché à environ 25-50 % de son poids traité avant la phase d'extraction.

35 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé par le fait que l'extrait est séparé du tissu animal par filtration, par centrifugation ou par décantation.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé par

le fait que la filtration est effectuée en deux phases, à savoir une première filtration grossière à travers un tamis large pour éliminer les morceaux de tissu animal et une seconde filtration fine à travers une matière cellulosique.

5 14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé par le fait que l'acide hyaluronique chimiquement modifié est récupéré à partir de l'extrait par précipitation avec un solvant, par exemple de l'acétone, de l'éthanol ou de l'isopropanol, suivie par lavage et séchage de l'acide 10 hyaluronique chimiquement modifié précipité résultant, un acide minéral, par exemple HCl, H_2SO_4 ou H_3PO_4 ou un électrolyte, par exemple de l'acétate de sodium ou du NaCl, pouvant être ajouté pendant la phase de précipitation.

15 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé par le fait que l'acide hyaluronique chimiquement modifié est retiré de l'extrait par lyophilisation.

20 16. Procédé de réticulation de l'acide hyaluronique chimiquement modifié obtenu selon le procédé de l'une des revendications 1 à 15, caractérisé par le fait qu'il consiste à soumettre l'acide hyaluronique chimiquement modifié à une réaction de réticulation avec du sulfone de divinyle dans des conditions alcalines à la température ambiante pendant environ 1 heure.

25 17. Préparation d'acide hyaluronique chimiquement modifié, caractérisée par la présence d'environ 0,005 % à 0,05 % en poids de groupes aldéhyde de réticulation liés de manière covalente aux chaînes polymères d'acide hyaluronique.

2582002

1/7

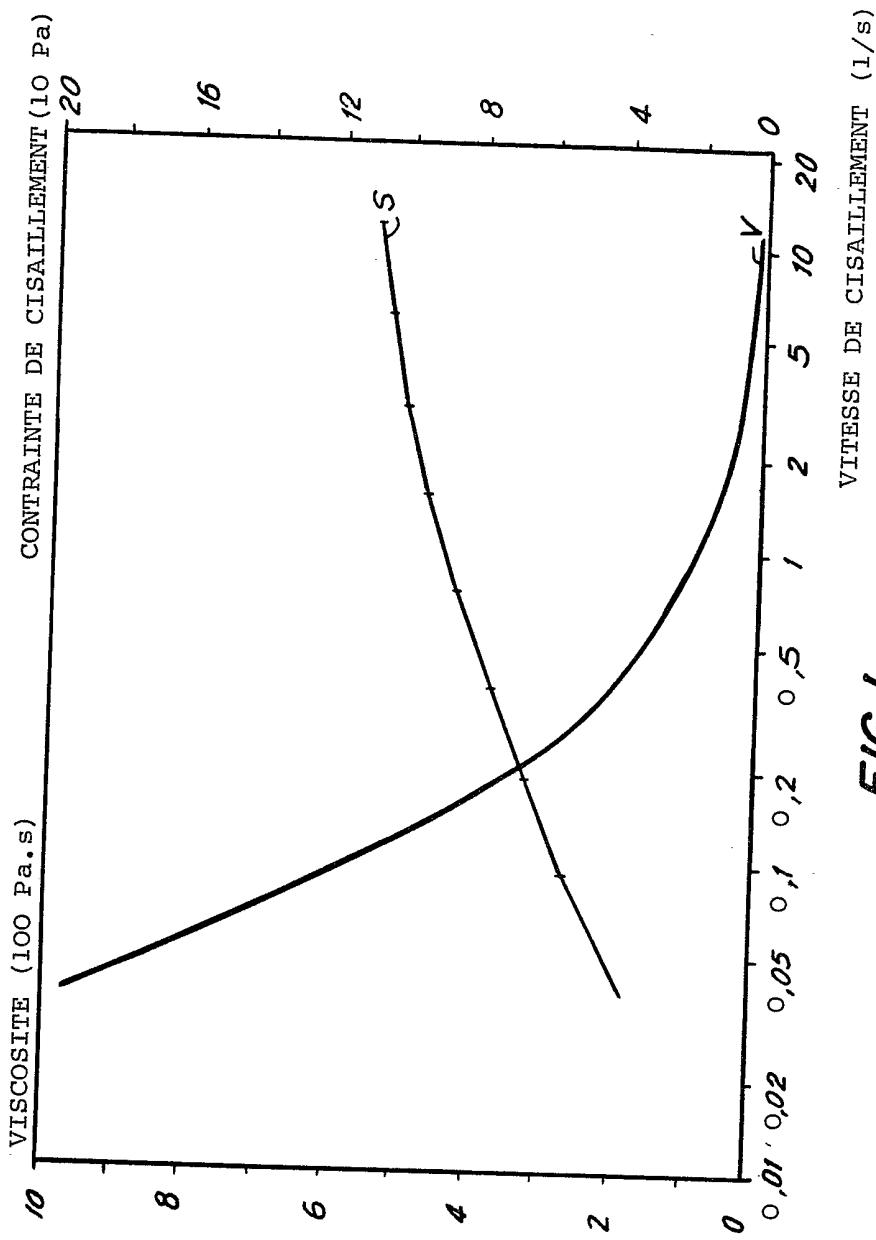


FIG. I

2582002

2/7

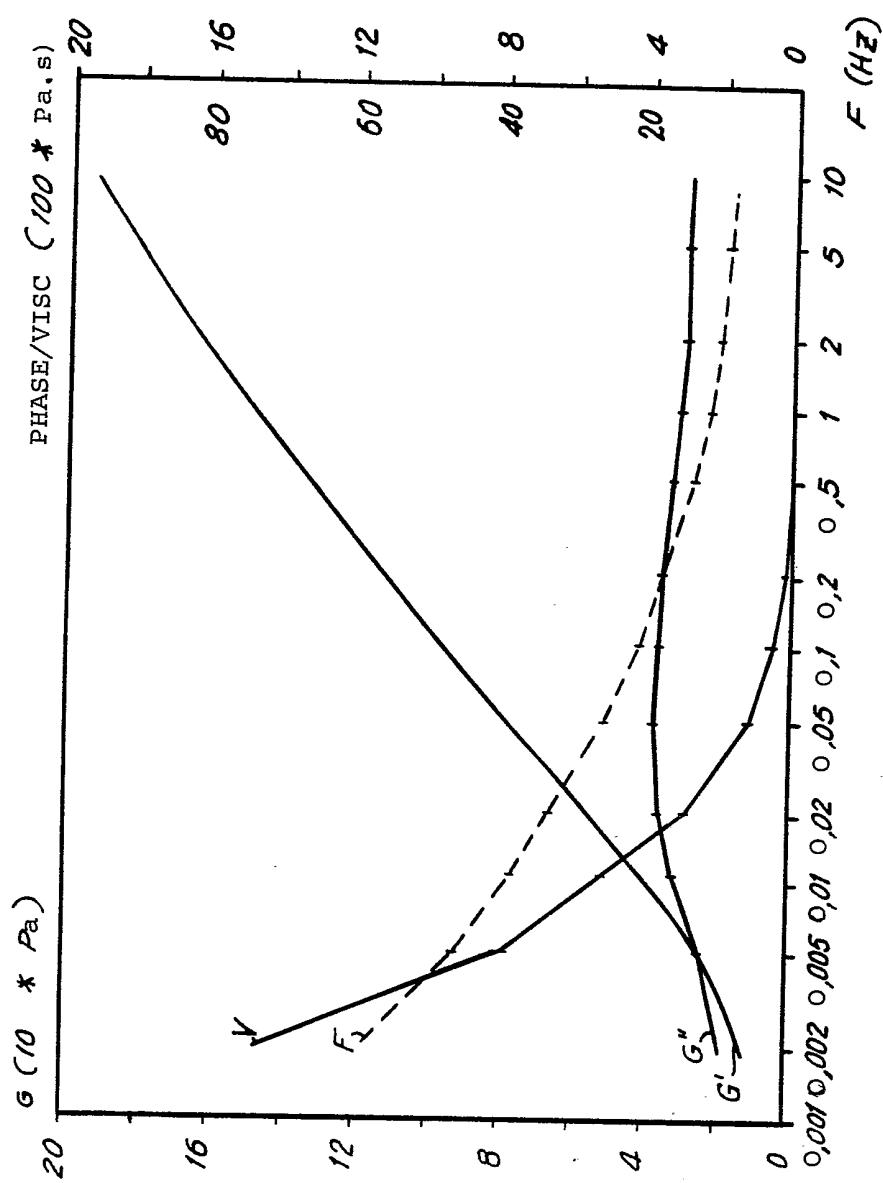


FIG. 2

2582002

3/7

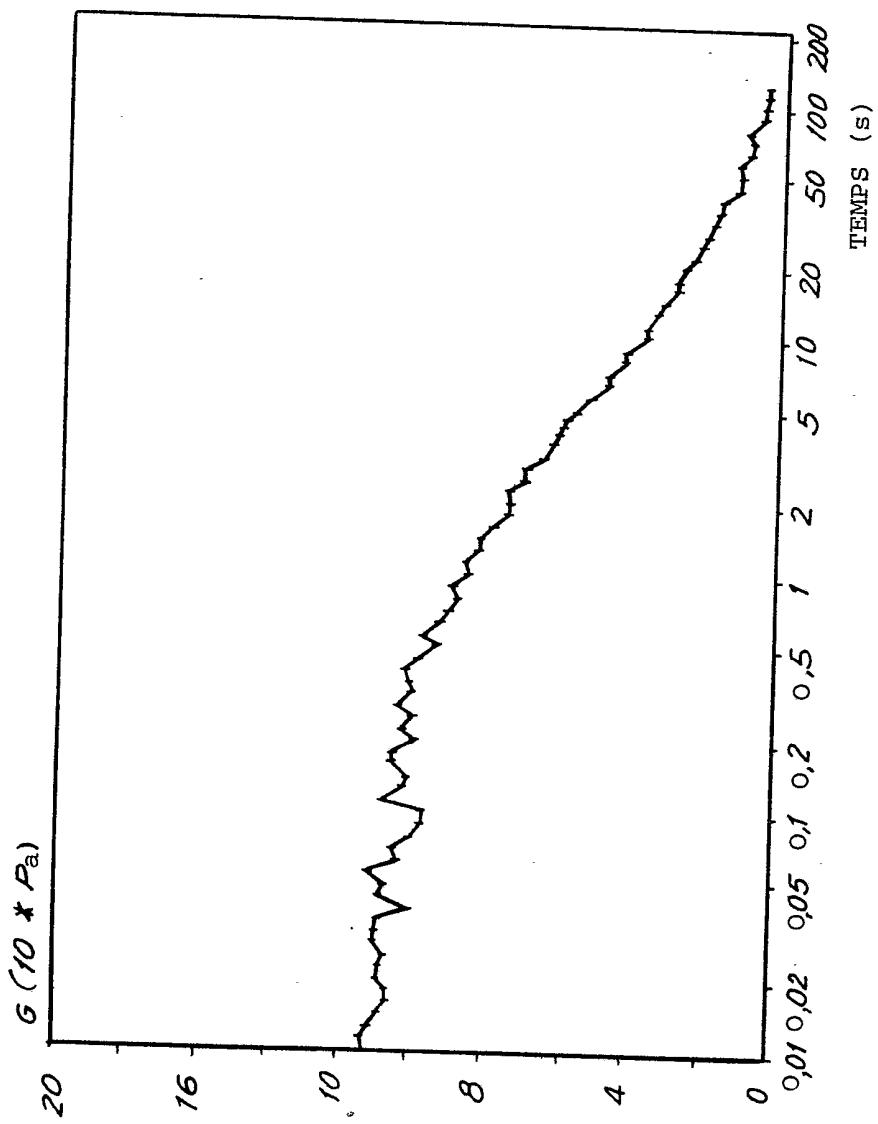


FIG. 3

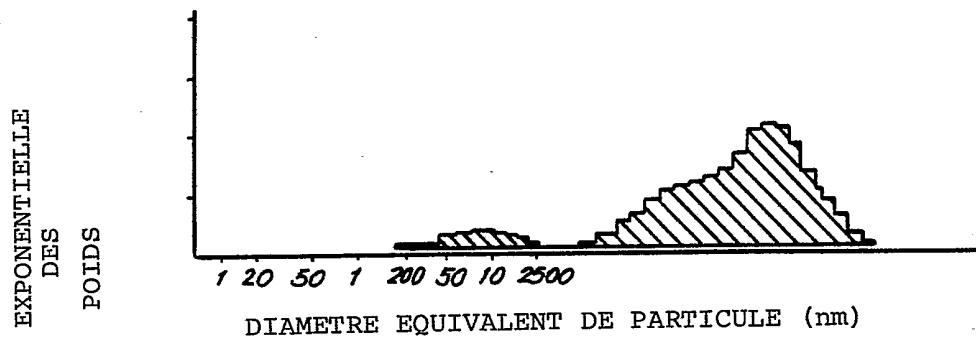


FIG. 4

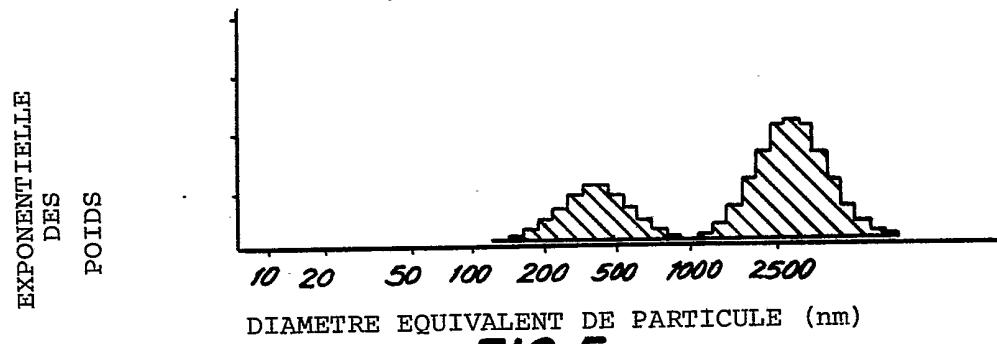


FIG. 5

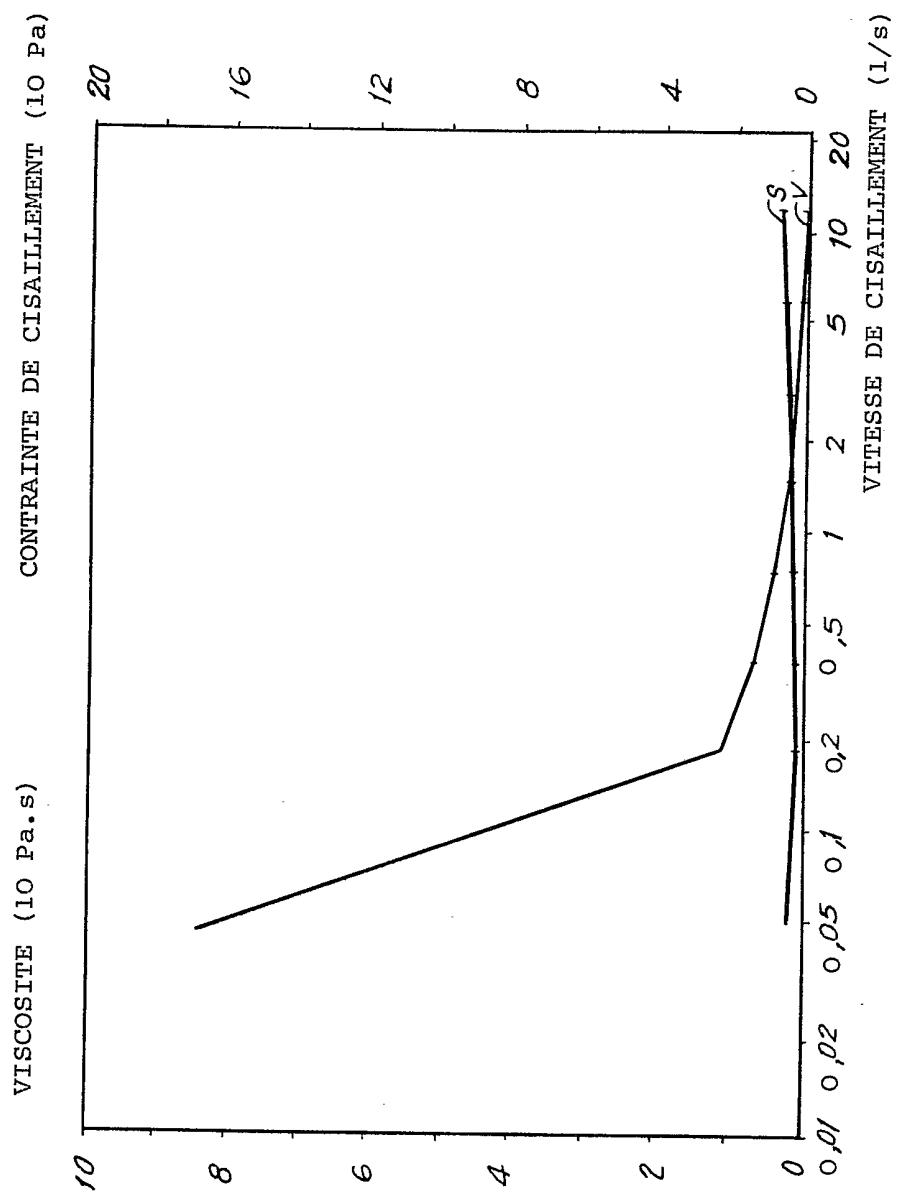


FIG. 6

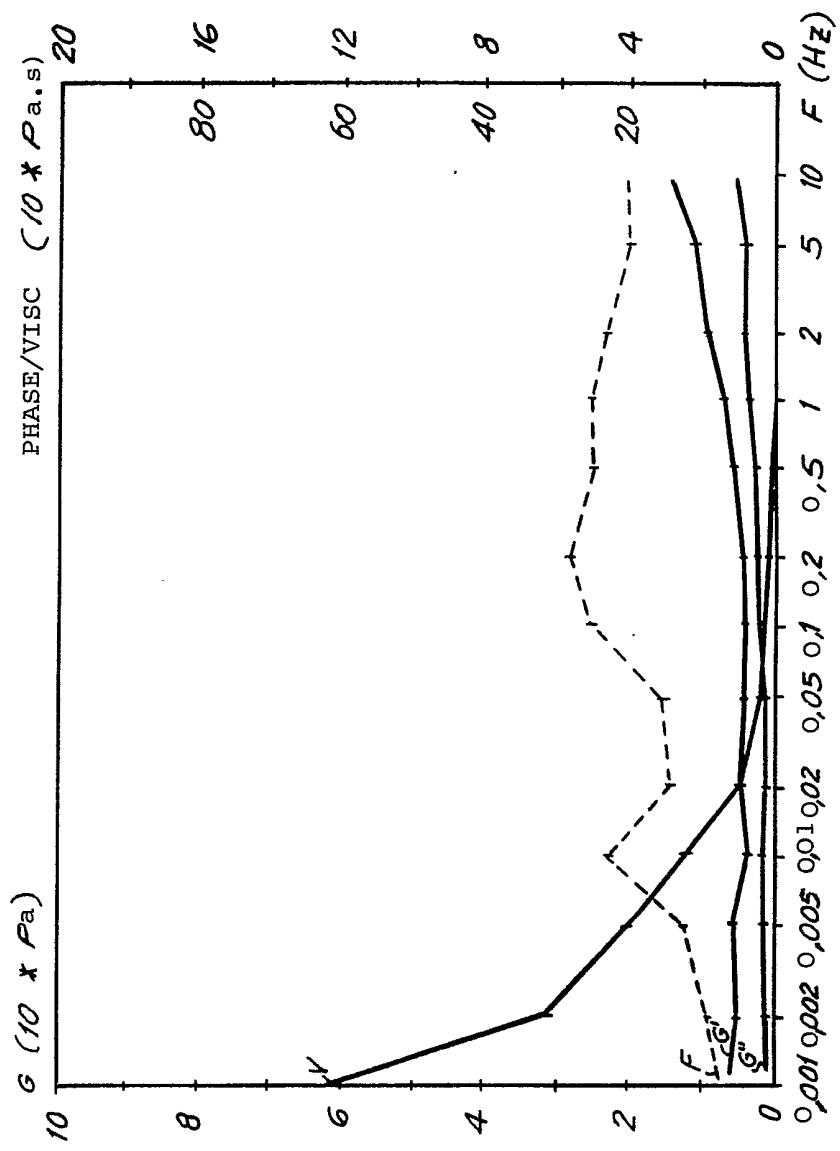


FIG. 7

2582002

7/7

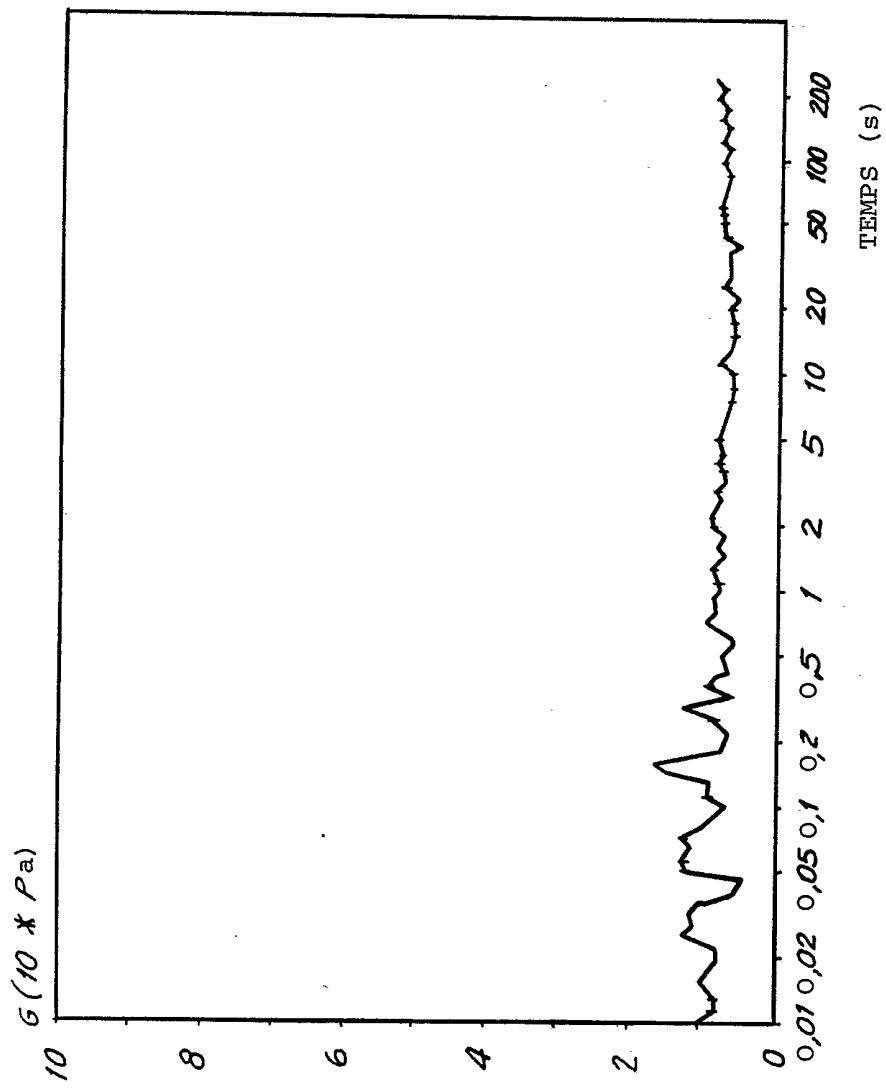


FIG. 8