

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21) **N° 81 03792**

(54) Procédé de purification des glucosaminoglucanes.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 08 B 37/10; B 01 D 13/00.

(22) Date de dépôt..... 25 février 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Italie, 29 février 1980, n° 20314 A/80; 9 février 1981, n° 47754 A/81.*

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 41 du 9-10-1981.

(71) Déposant : ITALFARMACO SPA, société de droit italien, résidant en Italie.

(72) Invention de : Pietro Cremonesi et Giancarlo Sportoletti.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Malémont,  
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

La présente invention concerne les glucosaminoglucanes et leur activité biologique et thérapeuthique. Plus particulièrement, l'invention concerne l'activité anticoagulante, antilipémique et anti  $X_a$  des glucosaminoglucanes.

En raison de leur structure chimique, les glucosaminoglucanes font preuve d'un caractère polydispersé de poids moléculaires et on n'a pas encore clairement établi le rapport qui existe entre leur activité biologique, leur structure et leur poids. Récemment, plusieurs exposés ont été publiés dans la littérature spécialisée pour démontrer qu'il est possible d'effectuer le fractionnement des glucosaminoglucanes en se basant sur leur poids moléculaire ou sur leur affinité pour d'autres substances possédant une activité biologique appropriée. Il serait incontestablement très souhaitable du point de vue thérapeuthique de pouvoir obtenir des fractions plus pures et aussi des fractions ayant un degré plus élevé d'activité spécifique, qu'il s'agisse de l'activité anti-coagulante, anti-lipémique ou anti-thrombotique. Par exemple, dans le cas de l'héparine dont la répartition moyenne des poids moléculaires se situe entre 5 000 et 20 000, L.O. Andersson, T.W. Barrowcliffe, E. Holmer, E.A. Johnson et G.E.C. Sims dans Thrombosis Research, 9, 575-583 (1976) ; R. Jordan, D. Beeler, R. Rosenberg, dans J. Biol. Chem. 254, 2902-2913 (1979) ; et H.J. Rodriguez et A.J. Vanderwielen, dans J. Pharm. Sci. 68, 588-591 (1979), ont démontré que les fractions ayant un poids moléculaire moyen de 5 000 à 14 000 font preuve d'une activité anti-coagulante spécifique de l'ordre de 40 % d'une fraction dont le poids moléculaire moyen est de 12 000.

Les fractions ayant un poids moléculaire de 5 000, qu'on obtient par chromatographie et qui ont une affinité envers l'anti-thrombine, donnent des fractions dont certaines possèdent une forte activité anti-coagulante, par exemple de 250 à 300 U.I./mg, alors que d'autres fractions ont une activité anti-thrombotique ou anti-lipémique. En général, on a effectué les procédés de fractionnement à l'échelle de laboratoire en mettant en oeuvre des techniques de chromatographie. Même quand il est possible d'élargir ces procédés à une plus grande échelle, les fractions sont susceptibles d'être contaminées et la stabilité des supports chromatographiques est susceptible d'être détériorée, ces deux phénomènes constituant un obstacle sérieux à l'application des procédés indiqués à l'échelle industrielle sous forme de procédés continus. En outre, en plus des problèmes exposés ayant trait à l'enrichissement ou à l'isolement des activités, on se heurte à d'autres problèmes inhérents aux glucosaminoglucanes du commerce. Plus précisément, on prépare les glucosaminoglucanes en utilisant des organes de plusieurs animaux tels que les bovins, les porcs, etc., les organes utilisés étant les poumons, les muqueuses intestinales etc.

Les procédés d'extraction sont très complexes car ils comprennent un stade de protéolyse enzymatique des glycoprotéines (matière de départ), la formation de sels avec des sels d'ammonium quaternaire ou l'utilisation de résines échangeuses d'ions et, en général plus d'une précipitation avec 5 des solvants alcooliques en présence de sels etc. On doit ensuite soumettre le produit brut provenant de la première purification à d'autres purifications qui prennent beaucoup de temps et qui permettent d'obtenir des glucosaminoglucanes commerciaux variés de haute pureté. En tous cas, dans le produit purifié il est probable que persistent :

10 a) des impuretés organiques ou minérales qui, d'une part, ne font pas preuve d'activité biologique spécifique et qui, d'autre part, risquent de poser des problèmes technologiques sérieux lors de l'utilisation réelle, ces impuretés tendant en outre à abaisser l'activité biologique spécifique, par exemple le nombre d'U.I. d'anticoagulant/mg ;

15 b) des impuretés dont la présence est inacceptable en raison de l'activité potentielle négative inhérente au niveau biologique ; parmi les impuretés de ce type, il convient surtout de citer les substances oxydantes utilisées au stade final pour décolorer le produit.

20 On a proposé plusieurs procédés, dont certains n'ont pas encore été brevetés, qui aboutissent plus ou moins efficacement à l'élimination de ces impuretés. Ces procédés sont fondés sur l'emploi des résines échangeuses d'ions, la précipitation sélective etc.

25 L'essence de la présente invention est la découverte selon laquelle il est possible d'utiliser des procédés facilement adaptables à une production à plus grande échelle, permettant d'obtenir des glucosaminoglucanes ayant un degré plus élevé de pureté que celui des glucosaminoglucanes du commerce ou d'augmenter l'activité spécifique du produit.

30 Les procédés qui font l'objet de l'invention sont basés sur la découverte selon laquelle il est possible de fractionner des glucosaminoglucanes présentant des poids moléculaires polydispersés et/ou, plus précisément, d'éliminer certains composants ayant de faibles poids moléculaires et une activité biologique médiocre, par exemple l'héparine, qui fait preuve d'une faible activité anti-coagulante, et ce en utilisant des membranes. Certaines membranes sont déjà connues et sont capables de laisser passer des 35 substances prédéterminées à travers elles, selon les propriétés caractéristiques de la membrane ou selon les propriétés physico-chimiques du solvant ou encore les propriétés physico-chimiques de la solution.

Le procédé selon l'invention consiste à soumettre une solution de glucosaminoglucanes à purifier, à une ultrafiltration ou hyperfiltration

(exosmose) ou encore à une dialyse à l'aide de membranes appropriées à une concentration convenable et dans des conditions qui seront exposées plus en détail dans les exemples ci-après, de manière à obtenir un passage partiel à travers les membranes.

5 D'une façon générale, on peut utiliser l'ultrafiltration, l'exosmose ou la dialyse par écoulement selon le type du produit final recherché ainsi que selon le degré de pureté, ainsi comme on le verra en détail dans les exemples qui vont suivre.

10 D'autre part, il avait été indiqué que le traitement des sels métalliques de glucosaminoglucanes et surtout de l'héparine par des procédés impliquant la formation intermédiaire de l'acide libre correspondant, c'est-à-dire de l'acide héparinique, aboutit à une baisse de l'activité biologique du produit final. En général, on effectue un traitement de cette nature en utilisant des échangeurs d'ions. On a maintenant mis en évidence que si l'on 15 effectue le stade de libération de l'acide au moyen des procédés mentionnés ci-dessus, avec un réglage convenable de la température, on ne constate aucune diminution de l'activité biologique spécifique du produit final purifié.

20 Les exemples suivants servent à illustrer la nature du traitement des glucosaminoglucanes conformément à l'invention, permettant de réaliser un enrichissement ou un isolement des activités à l'aide d'une membrane, ces exemples n'ayant d'ailleurs aucun caractère limitatif.

EXEMPLE 1

Purification de l'héparinate de sodium par ultrafiltration à travers une membrane ayant un seuil de coupure de 10 000.

25 On utilise une solution d'une concentration de 1 à 15 % d'héparinate de sodium (U.I. 155/mg d'activité anticoagulante) dans de l'eau bidistillée. Il est encore préférable d'employer une solution d'une concentration de 7 % qu'on soumet à une ultrafiltration dans un appareil convenable, par exemple l'appareil 30 Amicon modèle 52, en maintenant la solution sous une agitation adéquate pour éviter les phénomènes de polarisation qui proviennent de la concentration à proximité de la membrane. Ceci permet de retenir les flux de diffusion à travers la membrane à un degré suffisant, par exemple à raison de 0,2 cm/mn, en appliquant des pressions comprises entre environ  $0,5 \cdot 10^5$  et  $5 \cdot 10^5$  Pa. Les conditions finales sont : température 20°C mais on peut utiliser une température comprise entre 4 et 35°C ; et pH de la solution de 6,5 mais avec possibilité 35 d'utiliser un pH situé entre 2,5 et 8,5.

On peut également utiliser une membrane dont le seuil de coupure est inférieur à 10 000 par exemple, Amicon PM 10.

On concentre la solution à l'aide de l'appareil d'ultrafiltration jusqu'à une valeur d'environ 50 % de la valeur initiale. La matière qui traverse la membrane est recueillie et on la soumet à une lyophilisation. Le titre biologique de la matière après lyophilisation, exprimé en unités anti-coagulantes, est inférieure à 100 U.I./mg ; l'activité anti  $X_a$  est de 180 U.I./mg.

La matière qui ne traverse pas la membrane est recueillie puis lyophilisée. Le titre biologique de cette matière exprimé en unités anti-coagulantes est de 193 U.I./mg ; l'activité anti  $X_a$  est de 78 U.I./mg.

10

EXEMPLE 2

Purification de l'héparinate de sodium par ultrafiltration à travers une membrane ayant un seuil de coupure nominal de 5 000

On procède de la même façon que dans l'exemple 1 sauf qu'on utilise une membrane ayant un seuil de coupure nominal inférieur à 5 000. Un exemple d'une telle membrane est le produit Berghoff BM 50. Les valeurs d'activité biologique de la matière qui traverse la membrane sont 11 U.I./mg alors que pour la matière qui ne traverse pas la membrane cette activité est de 189 U.I./mg (anti  $X_a$  = 196 et 50 U.I./mg. respectivement).

20

EXEMPLE 3

Purification de l'héparine par hyperfiltration à travers une membrane dont le seuil de coupure est inférieur à 600.

On peut utiliser une solution aqueuse d'héparine, sous forme de son sel de sodium, de son sel de calcium ou d'un autre ion, ayant une concentration située entre 1 et 15 % mais, de préférence, de 4 %. On soumet cette solution à une hyperfiltration à l'aide d'un appareil convenable muni d'une pompe d'alimentation sous une pression de  $2 \cdot 10^5$  à  $25 \cdot 10^5$  Pa mais, de préférence, supérieure à  $5 \cdot 10^5$  Pa. La solution d'héparine s'écoule en un courant laminaire sur une membrane convenable, par exemple Osmonix Sepa 50, dont le seuil de coupure est inférieur à 600.

On obtient une matière qui traverse la membrane (non analysée). La matière qui ne traverse pas la membrane est recyclée. On maintient la concentration d'héparine dans la matière recyclée à une valeur constante par des additions continues d'eau.

De cette façon, on arrive à un résultat qui est l'élimination à partir de la solution initiale de toutes les substances ayant un poids moléculaire inférieur à 600 et qui, dans tous les cas, traversent la membrane.

Dans l'essai considéré, on utilise le sel de sodium de l'héparine ayant une activité anticoagulante de 171 U.I./mg et possèdant un fort pouvoir

oxydant, ce pouvoir oxydant étant dû au procédé mis en oeuvre pour la décoloration de la matière à l'aide d'eau oxygénée ou de peracides.

Le sel de sodium de l'héparine qu'on récupère dans la matière n'ayant pas traversé la membrane fait preuve d'une activité anti-coagulante de 178 U.I./mg mais en l'absence d'un pouvoir oxydant quelconque.

Le rendement du procédé est de plus de 90 % (en poids).

EXEMPLE 4

Purification de l'héparine par dialyse à écoulement en vue de l'élimination des substances oxydantes.

On utilise des solutions aqueuses d'héparine sous forme de sel de sodium, de sel de calcium ou d'un autre sel pour la mise en oeuvre de cet essai. La concentration est de 1 à 20 %, de préférence de 5 %. On dialyse les solutions à l'aide d'un dialyseur à écoulement laminaire du type employé habituellement pour l'hémodialyse, comportant des fibres creuses ou des couches multiples, contre les solutions aqueuses ayant un pH de 2 à 3. On règle le pH à l'aide d'un acide minéral.

On maintient la température entre 4 et 7°C à l'aide d'un système de refroidissement convenable.

La vitesse d'écoulement utilisée dans cet essai est comprise entre 10 et 100 ml/mn par  $0,7 \text{ m}^2$  de membrane dans le compartiment de la solution dialysante et cette vitesse est de 20 jusqu'à 400 ml/mn par  $0,7 \text{ m}^2$  de membrane dans le compartiment dialysé.

On recycle la solution dialysante qui contient l'héparinate de sodium pendant que la solution est continuellement renouvelée dans le compartiment du dialysat.

On laisse la dialyse se poursuivre jusqu'à disparition de tout pouvoir oxydant dans la solution de la substance dialysante ainsi que dans le dialysat. On transforme successivement l'acide héparinique en héparinate de calcium par neutralisation avec l'oxyde de calcium et traitement par le chlorure de calcium, en utilisant pour cela l'un des procédés bien connus.

L'héparinate de calcium recueilli par précipitation alcoolique présente un titre anti-coagulant égal à 156 U.I./mg quand on utilise l'héparinate de sodium comme matière de départ ayant une activité anti-coagulante sensiblement égale.

REVENDICATIONS

1. Procédé de séparation des composants présentant une faible activité biologique ou une activité biologique spécifique, ou des composants inactifs, présents dans un glucosaminoglucane, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre le glucosaminoglucane sous forme d'un sel en solution aqueuse à un écoulement à travers une membrane appropriée pour l'ultrafiltration, l'hyperfiltration (exosmose) ou la dialyse avec passage partiel à travers ladite membrane, de sorte que les fractions de faible activité traversent la membrane alors que les fractions ayant une activité plus élevée ne traversent pas la membrane et sont concentrées.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution aqueuse du glucosaminoglucane s'écoule à travers une membrane d'ultrafiltration, cette membrane ayant un seuil de coupure nominal compris entre 1 000 et 15 000, pour obtenir des fractions présentant des activités biologiques spécifiques différentes.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution aqueuse du glucosaminoglucane s'écoule à travers une membrane d'hyperfiltration (exosmose) avec un rejet nominal du sodium situé entre 0 et 75 %.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution aqueuse de glucosaminoglucane s'écoule à travers une membrane de dialyse, le seuil de coupure nominal de cette membrane étant inférieur à 30 000.

5. Procédé selon la revendication 1 ou 4, caractérisé en ce qu'on effectue la dialyse avec des hémodialyseurs.

6. Procédé selon la revendication 1 ou 4, caractérisé en ce que la solution contre laquelle on effectue la dialyse par rapport à la solution de glucosaminoglucane est une solution aqueuse ayant un pH de 2 à 9.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le glucosaminoglucane est l'héparine sous forme de son sel de sodium ou de calcium.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on soumet l'héparinate de sodium dont l'activité anti-coagulante est de 155 U.I./mg à une ultrafiltration sur une membrane dont le seuil de coupure est 10 000, la matière récupérée à partir de la fraction qui ne traverse pas la membrane, après lyophilisation, faisant preuve d'une activité anti-coagulante de 193 U.I./mg, et d'une activité anti  $X_a$  de 78 U.I./mg, alors que les activités correspondantes du perméat sont respectivement inférieures à 100 et à 180 U.I./mg.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on soumet l'héparinate de sodium ayant une activité anti-coagulante de 155 U.I./mg

à une ultrafiltration sur une membrane ayant un seuil de coupure nominal de 5 000, et sépare la matière qui ne traverse pas la membrane et possède une activité anti-coagulante de 189 U.I./mg et une activité anti  $X_a$  de 50 U.I./mg, les activités correspondantes du perméat étant de 11 et de 196 U.I./mg,

5 respectivement.

10. Procédé selon la revendication 1 ou 3, caractérisé en ce qu'on soumet l'héparine sous forme d'un sel minéral à une hyperfiltration sur une membrane ayant un seuil de coupure de 600.

11. Procédé selon la revendication 1,4,5 ou 6, caractérisé en ce qu'on dialyse l'héparine sous forme d'un sel minéral contre une solution aqueuse ayant un pH de 2 à 3, récupère l'acide héparinique de la solution dialysante et convertit l'acide héparinique en un sel de calcium.

12. Glucosaminoglucane obtenu par mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendication 1 à 11.