

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 49628 B1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 31/728; C08B 37/08; B01D 61/14**
- (43) Date de publication : **30.09.2021**
- 
- (21) N° Dépôt : **49628**
- (22) Date de Dépôt : **17.07.2018**
- (30) Données de Priorité : **18.07.2017 IT 201700081449**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/IB2018/055291 17.07.2018**
- (71) Demandeur(s) : **Fidia Farmaceutici S.p.A., Via Ponte della Fabbrica 3/A 35031 Abano Terme (PD) (IT)**
- (72) Inventeur(s) : **CORSA, Vincenzo ; CARPANESE, Giancarlo**
- (74) Mandataire : **SABA&CO**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: **18749157.6**
- 
- (54) Titre : **PROCESSUS POUR LA PURIFICATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE**
- (57) Abrégé : L'invention concerne un processus de purification de HA, et des compositions pharmaceutiques, cosmétiques et nutritionnelles contenant du HA ainsi purifié.

**REVENDEICATIONS**

1. Procédé pour l'extraction et la purification d'acide hyaluronique (AH) à partir d'un bouillon de fermentation, préférentiellement à partir d'un bouillon de fermentation de microorganismes du genre *Streptococcus* ou *Bacillus*, en particulier *S. equi*, *B. subtilis* ou *B. megaterium*, plus préférentiellement *S. equi*, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'extraction comprenant ou consistant en les étapes suivantes :

- a. dilution du bouillon de fermentation filtré avec de l'eau purifiée, de 1,1 à 3 volumes, préférentiellement égale à 1,5 par rapport au volume initial ;
- b. recirculation forcée du bouillon provenant de l'étape a formé par l'union de rétentat et perméat, à l'intérieur de cassettes de filtre à flux tangentiel (FFT) contenant des membranes d'ultrafiltration fabriquées en matériau polymère arylsulfonique, préférentiellement polyethersulfone, avec une porosité allant de 5 000 à 300 000 daltons, préférentiellement de 50 000 à 200 000 et encore plus préférentiellement égale à 100 000 daltons, dans lequel la recirculation forcée est répétée pour un temps allant d'1 à 6 heures, préférentiellement égal à 3 heures, ladite recirculation étant réalisée avec un flux unidirectionnel et dans un système clos, à un volume constant sans introduire de liquides de l'extérieur.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'étape b. de recirculation forcée est suivie par les étapes suivantes :

- c. diafiltration I du rétentat contenu dans les cassettes de FFT de l'étape b. avec une solution de diafiltration sélectionnée parmi de l'eau purifiée et une solution saline, préférentiellement de l'eau purifiée ;
- d. concentration du volume dérivant de l'étape c. jusqu'à un volume égal à celui du bouillon de départ ;
- e. diafiltration II du volume dérivant de l'étape d. avec une solution de diafiltration sélectionnée parmi de l'eau purifiée et une solution saline, préférentiellement de l'eau purifiée, répéter ladite diafiltration de 5 à 15 fois, préférentiellement 6-12 fois ;
- f. concentration finale du volume dérivant de l'étape e. jusqu'à ce qu'un volume final égal à un tiers de celui du bouillon de départ soit obtenu ;
- g. récupération du produit retenu à l'intérieur des cassettes de FFT par la circulation d'eau purifiée jusqu'à ce qu'un volume égal à la moitié du bouillon

de départ soit obtenu.

3. Procédé selon l'une ou plusieurs des revendications précédentes, dans lequel le rendement du procédé va de 85 à 100 %, préférentiellement de 95 à 100 %.

4. Procédé selon l'une ou plusieurs des revendications précédentes, dans lequel l'AH purifié a une teneur totale en protéines < 0,1 % et une teneur en endotoxines bactériennes < 0,05 %.

5. Procédé selon l'une ou plusieurs des revendications précédentes, dans lequel le bouillon de fermentation est un bouillon de fermentation de *Streptococcus equi* sub-espèce equi 68222, mutant H-1.

6. Procédé selon l'une ou plusieurs des revendications précédentes, dans lequel l'AH purifié est sous forme d'un sel de métaux alcalins ou alcalino-terreux, préférentiellement alcalins, et encore plus préférentiellement sous forme de sel de sodium.

7. Procédé d'extraction d'acide hyaluronique (AH) à partir d'un bouillon de fermentation, préférentiellement à partir d'un bouillon de fermentation de microorganismes du genre *Streptococcus* ou *Bacillus*, en particulier *S. equi*, *B. subtilis* ou *B. megaterium*, plus préférentiellement *S. equi*, ledit procédé comprenant ou consistant en les étapes suivantes :

a. dilution du bouillon de fermentation filtré avec de l'eau purifiée, de 1,1 à 3 volumes, préférentiellement égale à 1,5 par rapport au volume initial ;

b. recirculation forcée du bouillon provenant de l'étape a. formé par l'union de rétentat et perméat, à l'intérieur de cassettes de filtres à flux tangentiel (FFT) contenant des membranes d'ultrafiltration fabriquées en matériau polymère arylsulfonique, préférentiellement polyethersulfone, avec une porosité allant de 5 000 à 300 000 daltons, préférentiellement de 50 000 à 200 000 et encore plus préférentiellement égale à 100 000 daltons, dans lequel la recirculation forcée est répétée pour un temps allant d'1 à 6 heures, préférentiellement égal à 3 heures, ladite recirculation étant réalisée avec un flux unidirectionnel et dans un système clos, à un volume constant sans introduire de liquides de l'extérieur.

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le bouillon de fermentation est un bouillon de fermentation de *Streptococcus equi* sub-espèce equi, 68222, mutant H-1.