



N° 881.595

Classif. Internat.: A61K | C07G

Mis en lecture le: 07-08-1980

Le Ministre des Affaires Economiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;**Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;**Vu le procès-verbal dressé le 7 février 1978 à 14 h. 55**au Service de la Propriété industrielle;***ARRÊTE :**

**Article 1.** — Il est délivré à la Sté dite : THE KITASATO INSTITUTE,  
9-1, Shirokane 5-chome, Minato-ku, Tokyo-to (Japon)

repr. par l'Office Hanssens S.P.R.L. à Bruxelles,

un brevet d'invention pour : Inducteur d'interféron et son procédé  
de fabrication,  
(Inv. : Y. Kojima, S. Konno et T. Hashimoto),

qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet  
déposées au Japon le 7 février 1979, n° 13024/79 et  
le 27 décembre 1979, n° 170641/79

**Article 2.** — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et  
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit  
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêt demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention  
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui  
de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 7 août 1978

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE:

Le Directeur

L. SALPETEUR

B. 15516.

881553

BREVET D'INVENTION.

Société dite : THE KITASATO INSTITUTE.  
-----

Inducteur d'interféron et son procédé de fabrication.  
-----

(Inventeurs : YASUHIKO KOJIMA, SEISHI KONNO et TAKASHI HASHIMOTO).

Convention Internationale - Priorité de deux demandes de brevets  
déposées au Japon, le 7 février 1979 sous le No. 13024/79 et le  
27 décembre 1979 sous le No. 170641/79, au nom de la déposante.  
-----

001505

Inducteur d'interféron et son procédé de fabrication.

L'invention concerne un inducteur d'interféron.

L'interféron, désigné ci-après par l'abréviation de FI, ou facteur inhibiteur de virus, est une substance capable d'agir sur les cellules animales pour inhiber la croissance d'un virus et elle est constituée d'un type de protéine libérée par la cellule en réponse à l'infection virale. L'activité anti-virale du FI est spécifique vis-à-vis d'une espèce animale et non spécifique vis-à-vis d'une espèce virale, et elle peut être variable dans les différentes conditions utilisées pour son induction. On sait aussi que la croissance de certains virus du type de tumeurs animales peut être inhibée de façon appréciable par le FI dans certaines conditions.

Une substance capable d'agir sur les cellules animales pour induire le FI est dénommée inducteur de FI. Un inducteur de FI présente donc un intérêt potentiel pour la prévention et le traitement de diverses maladies humaines et animales causées par l'infection virale. On n'a toutefois jamais utilisé dans la pratique divers inducteurs connus de FI, en raison de certains inconvénients sérieux. C'est ainsi, par exemple, que le brevet des Etats-Unis d'Amérique No. 3.583.893 décrit, comme inducteur de FI, un acide ribonucléique à double spirale, produit en utilisant un microorganisme et mentionne, dans la description de l'art antérieur, qu'un grand nombre de substances, comprenant des bactéries, des virus, des polysaccharides, des agents mitogéniques, l'endotoxine et autres substances semblables, stimulent la formation d'interféron, mais qu'aucune d'entre elles n'est intéressante pour un usage courant à cause, inter alia, de leur toxicité, de leur caractère antigénétique et de leur nature infectieuse. D'autres inducteurs de FI connus sont décrits, par exemple, dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique Nos. 3.773.924 et 3.884.845 et dans la demande de brevet japonais Kokai Koho No. 121919/78. Ces inducteurs de FI ne sont toutefois pas isolés à partir de plantes, et il est également connu que les inducteurs de FI provenant de microorganismes sont en général désavantageux pour des applications thérapeutiques, en raison de leur haute toxicité.

Des exemples d'agents mitogéniques connus sont donnés

par la phytohémagglutinine [Whitlock, Science, 149:310 (1965)], le mitogène de la phytolaque [Friedman et col., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125:901 (1967)], et la concanavaline A [Willen et col., Cell. Immunol., 6:110 (1973)], respectivement isolées à partir des tissus du flageolet, de la phytolaque et de la fève-  
 5 role. Cependant, en raison de leur activité inductrice de FI extrêmement faible, aucun essai fructueux n'a été tenté pour utiliser ces agents mitogéniques pour la prévention ou le traitement des diverses maladies humaines et animales dues à l'in-  
 10 fection virale.

On connaît aussi d'autres inducteurs de FI isolés à partir des tissus de plantes supérieures. Par exemple, dans la demande de brevet japonais Kokai Koho No. 32107/78, on décrit un inducteur de FI que l'on suppose être une espèce de saccha-  
 15 ride hétéropolymère, contenant comme constituants principaux de l'haxose (48 %), une protéine (5 %), et de l'acide uronique (40 %), d'un poids moléculaire supérieur à 100.000, qui est isolé à partir de la racine de Angellica acutiloba Kitagawa (nom japonais Toki) ; on l'extrait par l'eau chaude, pour obte-  
 20 nir une solution d'extraction, que l'on soumet à la dialyse pour obtenir un résidu, auquel on ajoute de l'acétone pour obtenir un précipité, que l'on lyophilise. On peut, si on le désire, ajuster la solution d'extraction à une quantité convenable en la concentrant sous pression réduite, ou en utilisant une mem-  
 25 brane dite "Diaflo", suivie de dialyse. Ultérieurement, dans la demande de brevet japonais Kokai Koho No. 99313/78, on décrit un inducteur de FI, d'un poids moléculaire de plus de 20.000 (principalement de plus de 100.000), contenant comme consti-  
 30 tuants principaux un glucose lié en 1-3 (hexose : plus de 90 %), que l'on obtient à partir de pelures de racines de mûrier telles que Morus alba Linne (nom japonais Maguwa) ou Morus bombycis Koizdumi (nom japonais Yamaguwa) ; on extrait ces pelures à l'eau chaude, on ajoute un solvant organique à la solution d'extraction pour obtenir un précipité, on ajoute une petite  
 35 quantité d'eau au précipité, on soumet la solution à la dialyse pour obtenir un résidu et on lyophilise ce dernier. On peut, si on le désire, ajuster la solution avant et/ou après dialyse, à un volume convenable par concentration sous pression réduite ou

en utilisant une membrane "Diaflo".

Ces deux inducteurs de FI présentent une faible toxicité et sont d'une production aisée. Toutefois, les sources abondantes et peu coûteuses des tissus de plantes dont on les extrait peuvent venir à manquer, par suite de l'usage continué qui en est fait depuis plusieurs années, comme sources de médicaments traditionnels sino-japonais.

La présente invention a pour objet un inducteur de FI, de propriétés excellentes, ainsi que leur procédé de fabrication. L'invention est basée sur la découverte qu'une substance, isolée des tissus de diverses plantes appartenant au genre *Carthamus*, de la famille de *Compositae*, et de leurs variantes, présente une excellente activité inductrice de FI et une faible toxicité. On peut, de plus, isoler la substance active à partir des tissus de plantes, facilement et à bon marché.

Selon un mode de réalisation de l'invention, on obtient une substance présentant une activité inductrice de FI, qui est stable sous forme d'une poudre blanchâtre amorphe et qui, sous une forme sensiblement pure, présente les caractéristiques physicochimiques suivantes.

(1) Analyse élémentaire.

H :  $6,54 \pm 0,3 \%$  ; C :  $41,9 \pm 0,3 \%$  ; N :  $2,39 \pm 0,3 \%$ ,  
P :  $0,28 \pm 0,03 \%$ .

(2) Poids moléculaire.

Environ 100.000 à 3.000.000 (principalement environ 500.000 à 1.000.000) (mesuré par ultracentrifugation avec une ultracentrifugeuse analytique Spinco modèle E, vendue par la Société dite Beckman Instruments Inc., par ultrafiltration avec l'ultrafiltre Amicon et les membranes Amicon XM 50, XM 100A et XM 300, vendues par la Société dite Amicon Corp. et les membranes UK 50, UK 100 et UK 200, vendues par la Société dite Toyo Roshi K.K., et par filtration sur gel, en utilisant le produit de dénomination commerciale Sephadex G-200, vendu par la Société dite Pharmacia Fine Chemical AB).

(3) Point de fusion ou de décomposition.

Point de fusion indéfini ; carbonise à environ 220°C.

(4) Spectre d'absorption UV.

Tel que représenté à la figure 1, décrite ci-après

(mesuré en solution de NaOH 0,1N) qui est le même si on le mesure en solution de NaOH 1N, ou dans l'eau. Paliers à environ 250 et 280 mμ.

(5) Spectre d'absorption IR.

5           Tel que représenté à la figure 2, décrite ci-après (par la méthode au KBr).

(6) Solubilité dans divers solvants.

10           Soluble dans l'eau et les solutions aqueuses de soude, potasse et ammoniacque ; pratiquement insoluble dans les solvants méthanol, éthanol, propanol, butanol, acétone, chloroforme et éther éthylique.

(7) Réactions colorées.

15           Positive dans les réactions de Ninhydrine, de phénol/ acide sulfurique, de Dittmer et dans le réactif de Folin ; négative dans la réaction d'Elson-Morgan.

(8) Nature acide.

(9) Principaux constituants chimiques.

| (a) amino-acides (+ 0,4 %) |                      |         |                         |
|----------------------------|----------------------|---------|-------------------------|
| 20                         | Oxyproline           | 15,61 % | acide aspartique 5,51 % |
|                            | thréonine            | 10,90 % | sérine 9,64 %           |
|                            | acide glutamique     | 3,96 %  | proline 4,27 %          |
|                            | glycine              | 9,09 %  | alanine 8,24 %          |
| 25                         | valine               | 4,04 %  | isoleucine 5,59 %       |
|                            | leucine              | 2,56 %  | phénylalanine 1,32 %    |
|                            | lysine               | 2,18 %  | arginine 1,24 %         |
|                            | tyrosine             | 1,94 %  | histidine 0,93 %        |
|                            | ammoniac             | 12,98 % |                         |
| 30                         | (b) sucres (+ 0,6 %) |         |                         |
|                            | Arabinose            | 9,38 %  | galactose 20,98 %       |
|                            | glucose              | 64,98 % | mannose 3,26 %          |
| 35                         | xylose               | 1,40 %  |                         |

On mesure les amino-acides présents, par hydrolyse par HCl 6N à 110°C pendant 48 heures sous vide, puis par analyse

en utilisant l'auto-analyseur d'acides-amino, vendu sous la  
dénomination commerciale de Technicon type NC-1, et on mesure  
les sucres présents, par hydrolyse par l'acide sulfurique 0,1N  
à 80°C pendant 20 minutes, et par l'acide sulfurique 1N à  
100°C pendant 2 heures, respectivement, puis par analyse avec  
l'auto-analyseur de sucres vendu sous la dénomination commer-  
ciale de Technicon type NC-1 (ces deux appareils sont vendus  
par la Société dite Technicon Corp.).

(10) Rotation optique.

$[\alpha]_D^{26} = +63^\circ \text{ à } 69^\circ (+66^\circ \text{ en moyenne})$   
(c = 0,49 % dans NaOH 0,1N).

Caractéristiques biologiques.

1) Activité inductrice de FI.

On utilise des échantillons de l'inducteur de FI de  
l'invention pour l'induction du FI dans les cellules et le  
sérum d'animaux d'essai et on mesure l'activité du FI obtenu,  
suivant la méthode décrite ci-après dans l'essai 1. Les résul-  
tats sont indiqués aux tableaux I et II qui montrent l'activité  
inductrice de FI positive.

TABEAU I

| Concentration de l'échantillon<br>(µg/ml) | 10   | 1,0  | 0,1 | 0,01 |
|-------------------------------------------|------|------|-----|------|
| Activité (in vitro)                       | >100 | >100 | 96  | <10  |

TABEAU II

| Activité<br>(in vivo) | Temps de prélèvement<br>du sang après l'administration (h) |    |     |     |    |
|-----------------------|------------------------------------------------------------|----|-----|-----|----|
|                       | 0                                                          | 1  | 2   | 4   | 6  |
| Lapin 1               | 15                                                         | 80 | 470 | 175 | 50 |
| Lapin 2               | 15                                                         | 90 | 500 | 280 | 70 |

Le tableau II, donnant les résultats obtenus suivant la  
méthode décrite ci-après dans l'essai 1, utilisant deux lapins,

1595

montre que l'activité atteint au maximum 2 heures après l'administration. La méthode de l'essai 1 confirme aussi que le FI est induit dans le corps de l'animal d'essai par l'action de l'inducteur de FI de la présente invention.

5 2) Stabilité de l'activité inductrice de FI.

On dissout des échantillons (chacun de 1 mg) de l'inducteur de FI de l'invention dans l'eau (1 ml) et on les chauffe respectivement à 100°C pendant un temps donné, ou à une température donnée pendant 1 heure. On traite ensuite chaque échantillon suivant la méthode de l'essai 1 (méthode in vitro) pour obtenir les résultats donnés aux tableaux III et IV, qui montrent que l'inducteur de FI de l'invention présente une haute stabilité à la chaleur.

TABLEAU III

15

20

25

| Température de chauffage (°C) | Activité FI à la concentration à l'échantillon (µg/ml) |      |     |      |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------|------|-----|------|
|                               | 10                                                     | 1,0  | 0,1 | 0,01 |
| Non traité                    | >100                                                   | >100 | 90  | <10  |
| 37                            | >100                                                   | >100 | 95  | <10  |
| 60                            | >100                                                   | >100 | 90  | <10  |
| 80                            | >100                                                   | >100 | 92  | <10  |
| 100                           | >100                                                   | >100 | 93  | <10  |
| Durée du chauffage : 1 heure. |                                                        |      |     |      |

TABLEAU IV

| Durée<br>du chauffage<br>(heure)  | Activité FI à la concentration<br>de l'échantillon (µg/ml) |      |     |      |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------|------|-----|------|
|                                   | 10                                                         | 1,0  | 0,1 | 0,01 |
| Non traité                        | >100                                                       | >100 | 92  | <10  |
| 37                                | >100                                                       | >100 | 95  | <10  |
| 60                                | >100                                                       | >100 | 93  | <10  |
| 80                                | >100                                                       | >100 | 65  | <10  |
| 100                               | >100                                                       | 75   | 35  | <10  |
| Température du chauffage : 100°C. |                                                            |      |     |      |

3) Toxicité aiguë.

On utilise comme animaux d'essai des souris mâles et femelles (race ddy ; âge 5 semaines ; poids  $20 \pm 1$  gramme ; groupes constitués chacun de 10 souris). On administre aux souris une solution physiologique de chlorure de sodium, contenant l'inducteur de FI de l'invention (ip. ou oralement) pour déterminer les valeurs  $DL_{50}$  de 1,5 g/kg (ip.) ou de 10 g/kg (oralement). On n'observe aucune différence appréciable entre les souris mâles et femelles.

4) Activité anti-tumorale.

On utilise comme animaux d'essai des souris de même race, âge, poids que ci-dessus, par groupes de 10 souris. On inocule à chaque animal, sous l'aisselle, un échantillon de tumeur solide S-180 Sarcoma (2 x 2 x 2 mm) ou de tumeur ascitique d'Ehrlich ( $2,5 \times 10^6$  cellules). Après 24 heures, on administre oralement à chaque souris, l'inducteur de FI de l'invention (0,2 mg) dissous dans l'eau. On effectue une administration par jour, qu'on poursuit pendant 14 jours. On observe un effet anti-tumoral appréciable.

D'après les caractéristiques précédemment indiquées, on constate que l'inducteur de FI de l'invention est un complexe de protéines et de sucres, contenant de l'acide phosphorique,

501505

ayant un poids moléculaire d'environ 100.000 à 3.000.000 (principalement d'environ 500.000 à 1.000.000). Cette substance est également conforme à la définition généralement admise pour tout inducteur de FI, car elle induit le FI dans les cellules ou le sérum de l'animal, in vivo ou in vitro, elle est inactivée par 0,08 % de trypsine à 37°C pendant 2 heures et, en outre, l'activité de la substance induite est spécifique vis-à-vis des espèces animales et non spécifiques vis-à-vis des espèces virales. On suppose donc que la substance de l'invention constitue non seulement un nouvel inducteur de FI, mais aussi une substance nouvelle per se, car elle présente des caractéristiques physico-chimiques et biologiques non encore observées à ce jour.

Par exemple, les agents mitogéniques connus, présentant une activité inductrice de FI (comme la phytohémagglutinine, le mitogène de phytolaque et la concanavaline A) sont des types de protéines de poids moléculaires supérieurs à 100.000 et d'une très faible activité inductrice de FI, qui est désactivée par chauffage à 56°C pendant 5 heures. Au contraire, l'inducteur de FI de l'invention a des constituants chimiques différents, il est thermiquement stable même à 100°C pendant plusieurs heures et son activité inductrice de FI est excellente. L'inducteur de FI connu, isolé dans la racine de Angellica acutiloba Kitagawa a aussi un haut poids moléculaire (supérieur à 100.000) et son activité inductrice de FI n'est pas désactivée par chauffage à 100°C pendant 1 heure. Toutefois, ses constituants chimiques (hexose 48 %, acide uronique 40 %, protéines 5 %) et son spectre d'absorption IR sont différents de ceux de l'inducteur de l'invention. L'inducteur connu, isolé dans les pelures de racines du mûrier contient, comme constituant principal, un glucose lié en 1-3 (hexose 96 %) et son poids moléculaire est supérieur à 20.000 (principalement supérieur à 60.000) ; il diffère donc également de l'inducteur de FI de l'invention. De plus, l'activité mitogénique rencontrée dans des inducteurs connus de FI, provenant de l'endotoxine bactérienne et des plantes supérieures, est très faible dans l'inducteur de FI de l'invention.

Diverses plantes, appartenant au genre Carthamus, qui

conviennent comme source du produit de l'invention contiennent, par exemple, la carthamine, la carthamone, la néocarthamine et autres substances semblables, qui diffèrent toutes de l'inducteur de FI de l'invention en ce qui concerne leurs caractéristiques physico-chimiques et biologiques et ne présentent pas d'activité inductrice de FI. Les caractéristiques physico-chimiques des inducteurs de FI connus, décrits dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique Nos. 3.773.924 et 3.884.845 et dans la demande de brevet japonais Kokai Koho No. 121219/78, sont différentes de celles de l'inducteur de FI de l'invention.

L'inducteur de FI de l'invention présente un intérêt potentiel comme médicament pour la prévention et le traitement de diverses maladies virales chez l'homme et l'animal, telles que celles causées par les virus du type des virus des tumeurs animales, car son activité inductrice de FI est excellente, comparativement à celle des inducteurs connus, isolés dans les tissus de plantes, et en raison de son activité même vis-à-vis des virus du type de ceux des tumeurs animales. De plus, sa toxicité est très faible lorsqu'on l'administre oralement à l'homme et à l'animal.

L'invention a encore pour objet un procédé de fabrication d'une substance présentant une activité inductrice d'interféron, selon lequel on extrait ladite substance d'une plante du genre *Carthamus*, de la famille de *Compositae*, ou de ses variantes contenant ladite substance, et on récupère la substance dans l'extrait obtenu.

Les plantes convenant au procédé de l'invention croissent en abondance, à l'état sauvage ou cultivé, dans un grand nombre de pays, ces plantes étant susceptibles de former diverses variantes, mutantes et hybrides, de façon naturelle ou artificielle. Par exemple, *Carthamus tinctorius* Linne (Safranum) est cultivé et utilisé depuis longtemps pour ses pigments jaunes et rouges et, à présent, on le cultive principalement dans divers pays, pour l'huile dans les akènes. Sa fleur a aussi été longtemps utilisée pour la fabrication de boissons sino-japonaises, mais la présence dans ses tissus d'une substance présentant une activité inductrice de FI était inconnue jusqu'à présent.

On peut utiliser l'une quelconque des plantes du genre *Carthamus*, lorsqu'elle contient la substance active de l'invention. Des exemples de telles plantes convenant à l'invention sont donnés par :

- 5            *Carthamus tinctorius* Linne ; *Carthamus lanatus* Linne ;  
             *Carthamus arborescens* Linne ; et leurs variantes telles  
             que *C. baeticus* Nyman.

Les noms botaniques utilisés ici proviennent des références suivantes : "Yakuyo Shokubutsu Dai Jiten", par Kariyone  
10 et Kimura, publié par Hirokawa Shoten, Tokyo (1974) ; "Saishin Yakuyo Shokubutsu", par Kariyone et Kimura, publié par Hirokawa Shoten, Tokyo (1978) ; "Flora Europaea", Vol. 4, publié par Cambridge University Press, Londres (1976) ; et "Illustrated  
15 Flora of the Pacific States", Vol. IV, Stanford University Press, CA. (1965).

En général, parmi les tissus d'une plante, c'est la fleur qui est riche de la substance active de l'invention.

Pour une meilleure conservation et extraction, il est préférable d'utiliser la plante séchée, bien qu'on puisse aussi  
20 utiliser la plante fraîche, si on le désire. La méthode de séchage est quelconque (séchage naturel, par l'air chaud, etc.) et on peut, si on le désire, laver la matière à l'eau avant de l'utiliser.

On peut effectuer l'extraction à l'eau à toute température convenable, par exemple entre la température ambiante et  
25 le point d'ébullition du mélange d'extraction. Etant donné que la substance active de l'invention est particulièrement soluble dans l'eau dans des conditions alcalines (par exemple, à pH entre 7 et 10), il est préférable d'ajuster le pH de l'eau  
30 avant l'emploi, par exemple avec une solution tampon convenable, ou de la soude, de la potasse ou de l'ammoniaque. La durée de l'extraction n'est pas critique, généralement de 1 à 5 jours à température ambiante, durée qui peut être diminuée si on élève la température de l'extraction. C'est ainsi que l'on peut  
35 effectuer l'extraction pendant une durée de 30 minutes à 6 heures, entre 40 et 100°C. Il est possible, selon l'invention, d'extraire une portion prépondérante de la substance active contenue dans le produit de départ (dans certains cas, plus de

90 %). On doit toutefois éviter l'emploi d'une température d'extraction excessivement élevée, car la quantité d'impuretés indésirables, telles que des pigments, des substances de bas poids moléculaire, etc., apparaissant dans l'extrait peut alors  
 5 augmenter. On peut aussi ajouter, si on le désire, un agent antiseptique convenable à l'eau d'extraction. On peut effectuer l'extraction en continu ou de façon intermittente, et on peut utiliser tout rapport commode de l'eau d'extraction à la substance brute.

10 Selon une variante, on peut extraire la substance active de l'invention, du tissu des plantes, à l'aide d'un solvant organique hydrophile (tel que méthanol, éthanol, propanol, butanol, acétone, etc.), en toutes proportions convenables, de 20 à 80 % par exemple. Ici encore, les durées et températures  
 15 de l'extraction sont celles qui conviennent (comme de 4 heures à 3 jours, à 40-80°C). Bien que l'extraction à l'eau soit plus simple, plus sûre et moins coûteuse, on peut extraire à l'aide des solvants organiques hydrophiles, malgré l'insolubilité du produit pur de l'invention dans de tels solvants, lorsque la  
 20 solution extraite contient un mélange ou un complexe de substances comme les acides gras, les stéroïdes, les protéines, la saponine, les mono- ou poly-saccharides et analogues. On suppose que l'extraction avec de tels solvants est rendue possible par effet tampon.

25 On sépare le résidu du tissu de la plante, de la solution extraite, selon les moyens usuels, par exemple par filtration, pressage, centrifugation, etc. On élimine ensuite les impuretés indésirables, telles que pigments et substances de bas poids moléculaire, de la liqueur surnageante, afin de per-  
 30 mettre la récupération de la fraction active. Des exemples des méthodes préférées utilisées dans ce but sont donnés ci-après.

A) On fractionne la liqueur surnageante par ultrafiltration, par exemple à l'aide d'une membrane convenable pour frac-  
 35 tionner les substances d'un poids moléculaire supérieur à 100.000, car la substance active de l'invention est présente sous forme de fractions de poids moléculaires d'environ 100.000 à 3.000.000 (principalement d'environ 500.000 à 1.000.000). On peut effectuer l'ultrafiltration sous une pression convenable,

par exemple de 0,1 à 5 kg/cm<sup>2</sup>, en utilisant une membrane capable de retenir les substances de poids moléculaire supérieur à 100.000 ou 200.000. On recueille alors les fractions actives qu'on combine, puis lyophilise, pour obtenir des poudres brunes.

5 B) On concentre, si nécessaire, la liqueur surnageante, sous pression réduite, puis on la traite par un solvant organique hydrophile (par exemple méthanol, éthanol, propanol, n-butanol, acétone, etc.) à des concentrations convenables (comme  
10 40 à 70 % en poids par volume) pour former des précipités contenant la substance active, puis lyophiliser les précipités pour obtenir des poudres brunes.

C) Au lieu du solvant organique, on peut ajouter à la liqueur surnageante un sel d'ammonium (comme du chlorure ou du sulfate d'ammonium, du bromure de cétyleméthylammonium, et analogues), ou un sel minéral métallique (comme le chlorure de zinc ou de cuivre et analogues) à une concentration convenable (comme 20 à 50 % en poids par volume) pour former un précipité. Le  
15 précipité est ensuite soumis au dessalage en utilisant une membrane de dialyse ou un ultrafiltre capable de retenir les substances d'un poids moléculaire de 5.000 à 10.000, puis on le  
20 lyophilise pour obtenir une poudre brune.

Il est possible de récupérer la majeure partie de la substance active contenue dans le produit de départ (dans certains cas, plus de 90 %). Cependant, la quantité d'impuretés  
25 contenues dans la poudre brute est la plus faible dans le cas de la méthode (A) qui est aussi la plus simple à effectuer. De plus, on constate que l'on peut éviter tout effet secondaire notable, même quand on administre oralement à l'homme et à  
30 l'animal une grande quantité de cette poudre brute obtenue suivant la méthode (A) ; on peut donc utiliser cette poudre brute, sans purification ultérieure, pour l'administration orale. A ce sujet, on remarque que l'on a utilisé par exemple le Safranum (Carthamus tictorius L.) pendant de nombreuses années dans le monde comme boisson populaire sino-japonaise et  
35 comme matière première pour la préparation de rouge et d'huile comestible.

On peut, si on le désire, purifier encore la poudre

brute obtenue, par exemple par chromatographie sur colonne, en utilisant un agent convenable pour la filtration sur gel, ou un échangeur d'ions. Dans le premier cas, on peut éluer à l'eau, bien qu'il soit possible d'utiliser une solution tampon convenable. Dans le second cas, on peut éluer avec une solution tampon convenable. Des exemples d'agents préférés pour la filtration sur gel sont donnés par ceux vendus sous les dénominations commerciales de Sephadex G-50 à G-200, Sephadex 2B à 6B, Sephacryl S-200 ou S-300 par la Société dite Pharmacia Fine Chemicals AB, par ceux vendus sous les dénominations commerciales de Bio-Gel P-30 à P-300, Bio-Gel A par la Société dite Bio-Rad Laboratories Ltd. et par celui vendu sous la dénomination commerciale de Sagavac par la Société dite Seravac Laboratories Ltd. ; des agents préférés pour le traitement par échange d'ions sont, par exemple, ceux vendus sous les dénominations commerciales de QAE-Sephadex A-25 et A-50 forme  $\text{Cl}^-$ , CM-Sephadex C-25 et C-50 forme  $\text{Na}^+$ , DEAE-Sephacel forme  $\text{Cl}^-$ , DEAE-Sepharose CL-6B forme  $\text{Cl}^-$ , CM-Sepharose CL-6B forme  $\text{Na}^+$  par la Société Pharmacia Fine Chemicals AB. On peut aussi utiliser pour la purification une cellulose convenable, échangeuse d'anions ou de cations. Le produit ainsi obtenu peut contenir certaines impuretés, bien que son activité inductrice de FI soit suffisante pour son application pratique. On peut, si on le désire, diminuer encore ces impuretés en combinant ces traitements.

L'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique comprenant comme ingrédient actif la substance de l'invention, telle que précédemment définie, en association avec une substance porteuse ou un excipient pharmaceutiques. La composition peut être sous une forme convenable pour son administration orale, rectale ou parentérale. Les compositions pour l'administration orale peuvent être solides ou liquides, sous forme de granules, de comprimés, enrobés ou non, de capsules, de sirops, d'émulsions, de suspensions ou de gouttes, de telles compositions contenant des substances porteuses ou des excipients pharmaceutiquement acceptables. Des excipients convenant à la préparation des comprimés comprennent, par exemple, du lactose, des amidons de pomme de terre, des amidons solubles

et du stéarate de magnésium.

Pour l'administration parentérale, la substance porteuse peut être un liquide stérile parentéralement acceptable, comme l'eau stérilisée, ou une huile, comme l'huile d'arachide, contenu en ampoules. Pour l'administration rectale, sous forme de suppositoires, la substance porteuse comprend une base pour suppositoires.

On peut avantageusement formuler la composition sous forme de doses unitaires, dont chacune fournit une dose fixe de l'ingrédient actif. Les comprimés, enrobés ou non, les capsules, les suppositoires et les ampoules constituent des exemples de formes convenables de doses unitaires.

L'invention a également pour objet la substance telle que précédemment définie, utilisée comme médicament.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui suit et à l'examen des exemples et dessins annexés, qui représentent plusieurs modes de réalisation suivant l'invention. Sur ces dessins, les figures 1 et 2 représentent, respectivement, les spectres d'absorption dans l'ultraviolet et dans l'infrarouge de la substance active de l'invention.

#### EXEMPLE 1

Dans une première opération, on lave à l'eau des fleurs séchées de *Carthamus tinctorius* Linne (2 kg), puis on laisse reposer dans l'eau (40 litres) à température ambiante pendant 3 jours, pour effectuer l'extraction, suivie de centrifugation (6.000 tours/minute) pendant 20 minutes pour séparer le résidu, que l'on lave deux fois à l'eau (10 litres chaque fois). On réunit le liquide de lavage avec la liqueur surnageante. La teneur totale en solides des solutions réunies est de 562,037 grammes (en poids sec). On fractionne les solutions réunies, par ultrafiltration avec un ultrafiltre vendu sous la dénomination commerciale de "Model UD-6 par la Société dite Bio Engineering K.K., et une membrane, vendue sous la dénomination commerciale de "UK 200" par la Société dite Toyo Roshi K.K., pour retenir les substances de poids moléculaire supérieur à 200.000, sous une pression de 3 kg/cm<sup>2</sup>, et obtenir un résidu qui est alors lyophilisé en donnant une poudre brune (89,46 g).

501505

5 A titre de comparaison, on effectue un traitement semblable en utilisant la membrane vendue sous la dénomination commerciale de "XM100A" par la Société dite Amicon Corp., pour retenir les substances de poids moléculaire supérieur à 100.000, et obtenir une poudre brune (93,50 grammes).

10 Dans une seconde opération, on dissout la première poudre brune (2 grammes) dans l'eau (5 ml) et on transfère la solution dans une colonne (4,5 x 70 cm) garnie de Sephadex G-200 pour la filtration sur gel. On élue à l'eau (600 ml) et on divise l'effluent en fractions (chacune de 3 ml). On recueille les fractions No. 25 à 55, qu'on réunit et lyophilise pour obtenir une poudre blanchâtre (155,04 mg).

15 Dans une troisième opération, pour purifier davantage, on dissout cette poudre (100 mg) dans une solution tampon de tris-HCl 0,1M (5 ml ; pH 7,0 ; I = 0,01) et on transfère la solution dans une colonne (2,5 x 70 cm) garnie de DEAE-Sephadex A-50 (échangeur d'ions) ; on élue avec une solution tampon de tris-HCl 0,1M (300 ml ; pH 9,0 ; contenant NaCl 0,5M) et on divise l'effluent en fractions, chacune de 3 ml. On recueille les fractions Nos. 16 à 27, qu'on réunit et lyophilise pour obtenir une poudre amorphe blanchâtre (72,3 mg) contenant moins d'impuretés et présentant une activité inductrice de FI pratiquement semblable à celle de la première poudre blanchâtre. Le produit final a les caractéristiques physicochimiques telles que précédemment décrites et sa haute pureté est confirmée par

20

25

30 A titre de comparaison, on mesure les activités inductrices de FI des substances obtenues dans les opérations respectives de cet exemple, suivant la méthode décrite ci-après dans l'essai 1 (in vitro), pour obtenir les résultats suivants.

**TABEAU V**

| Opération | Echantillon<br>recueilli après | Activité à la concentration<br>de l'échantillon (µg/ml) |      |      |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|------|------|
|           |                                | 10                                                      | 1,0  | 0,1  |
| 1         | Extraction                     | >100                                                    | <10  | <10  |
| 1         | Ultrafiltration                | >100                                                    | 95   | <10  |
| 2         | Filtration sur gel             | >100                                                    | >100 | 96   |
| 3         | Traitement par échange d'ions  | >100                                                    | >100 | >100 |

**EXEMPLE 2**

On effectue le même traitement que celui décrit dans l'exemple 1, si ce n'est qu'on extrait *Carthamus lanatus* Linne en laissant les fleurs reposer dans l'eau à température ambiante pendant 2 heures, puis on extrait encore à 100°C pendant 2 heures. Les caractéristiques physicochimiques du produit final (70,3 mg) sont pratiquement les mêmes que celles du produit final de l'exemple 1.

**ESSAI 1** - Mesure de l'activité inductrice de FI :

[Référence : Y. Kojima, Kitasato Arch. Exp.

Med., 43:35 (1970)].

(a) Induction de FI in vitro.

On sacrifie un lapin blanc (SPF de Nouvelle-Zélande ; poids d'environ 1 kg) par piqûre cardiaque, on recueille les cellules de sa rate, de sa moelle épinière et de sa lymphe nodale, qu'on réunit pour préparer une solution contenant les cellules mixtes ( $10^7$  cellules), qu'on divise en échantillons de 1 ml chacun. On ajoute indépendamment à quatre échantillons, 10, 1,0, 0,1 et 0,01 µg/ml d'un produit final préparé comme dans l'exemple 1, on cultive à 25°C pendant 24 heures, puis on centrifuge pour obtenir des liqueurs surnageantes, dont chacune est utilisée comme échantillon pour la mesure de l'activité inductrice de FI.

(b) Induction de FI in vitro.

On dissout dans 2 ml d'eau le produit final de l'exemple

151535

- 1 (1 mg) et on l'injecte dans la veine auriculaire d'un lapin blanc (SPF de Nouvelle-Zélande ; poids d'environ 1 kg). On prélève un échantillon de 2 ml de sang, 1, 2, 4 et 6 heures après l'administration à l'animal d'essai, on sépare le sérum du sang de chaque échantillon et l'utilise comme échantillon pour mesurer l'activité inductrice de FI.
- 5 (c) Mesure de l'activité FI.

- Dans les deux méthodes (a) et (b), on utilise comme virus d'attaque le virus Vesicular Stomatitis, pour la mesure de l'activité du FI induit, de la manière suivante. On place une culture monocouche des cellules doublées de RK-13 de lapin, dans un récipient et on lui ajoute une quantité prédéterminée de l'échantillon de solution obtenu en (a) ou (b) ci-dessus. On incube la culture à 37°C pendant la nuit, avec addition du virus Vesicular stomatitis comme virus d'attaque. On mesure l'activité FI en fonction du taux de réduction des plaques. On exprime l'unité d'activité FI selon le nombre inverse de la plus grande dilution d'échantillon requise pour réduire le nombre de plaques de 50 %.
- 10
- 15

20 ESSAI 2 - Définition de l'inducteur de FI.

- On constate que les échantillons préparés suivant les méthodes (a) et (b) inhibent la croissance du virus Vesicular stomatitis et du virus Vaccinia dans les cellules doublées de RK-13, provenant de lapins de la même espèce, alors qu'ils n'inhibent pas la croissance du virus Vaccinia dans les cellules L provenant de souris, d'une espèce animale différente. De plus, leurs activités de FI sont désactivées lorsqu'on les traite par la trypsine à 0,08 % à 37°C pendant 2 heures. Ces constatations confirment que la substance active de la présente invention représente un inducteur de FI.
- 25
- 30

ESSAI 3.

- Dans l'exemple 1, on effectue l'électrophorèse à 4°C, selon un processus usuel, en utilisant l'appareil vendu sous la dénomination commerciale de Model AE-2 par la Société dite Toyo Kagaku Sangyo K.K., avec une plaque de gel de polyacrylamide (épaisseur 3 mm) et un tampon d'acide borique 0,3M (pH 8,4). La bande unique formée indique que l'échantillon essayé est d'une haute pureté.
- 35

501535

Bien entendu, l'invention n'est nullement limitée aux exemples décrits, elle est susceptible de nombreuses variantes, accessibles à l'homme de l'art, suivant les applications envisagées et sans s'écarter pour cela du cadre de l'invention.

# REVENDEICATIONS

1. Substance présentant une activité inductrice d'interféron, qui est stable sous la forme d'une poudre amorphe blanchâtre, caractérisée par les propriétés physicochimiques suivantes :

5

(1) analyse élémentaire :

H :  $6,54 \pm 0,3 \%$ , C :  $41,9 \pm 0,3 \%$ , N :  $2,39 \pm 0,3 \%$ ,  
P :  $0,28 \pm 0,03 \%$  ;

10

(2) poids moléculaire : environ 100.000 à 3.000.000 (principalement environ 500.000 à 1.000.000) (mesuré par ultracentrifugation, ultrafiltration et filtration sur gel) ;

(3) point de fusion ou de décomposition : point de fusion indéfini, carbonise à environ 220°C ;

15

(4) spectre d'absorption dans l'ultraviolet : tel que représenté à la figure 1 (mesuré en solution dans NaOH 0,1N) ;

(5) spectre d'absorption dans l'infrarouge : tel que représenté à la figure 2 (méthode au KBr) ;

20

(6) solubilité dans divers solvants : soluble dans l'eau, facilement soluble dans les solutions aqueuses de soude, potasse et ammoniaque, pratiquement insoluble dans les solvants méthanol, éthanol, propanol, butanol, acétone, chloroforme et éther éthylique ;

25

(7) réactions colorées : positive dans les réactions de Ninhydrine, de phénol/acide sulfurique, dans le réactif de Folin et dans la réaction de Dittmer ; négative dans la réaction de Elson-Morgan ;

(8) nature : acide ;

(9) principaux constituants chimiques :

(a) amino-acides : ( $\pm 0,4 \%$ )

30

|                  |         |                  |        |
|------------------|---------|------------------|--------|
| oxyproline       | 15,61 % | acide aspartique | 5,51 % |
| thréonine        | 10,90 % | sérine           | 9,64 % |
| acide glutamique | 3,96 %  | proline          | 4,27 % |
| glycine          | 9,09 %  | alanine          | 8,24 % |
| valine           | 4,04 %  | isoleucine       | 5,59 % |
| leucine          | 2,56 %  | phénylalanine    | 1,32 % |
| lysine           | 2,18 %  | arginine         | 1,24 % |
| tyrosine         | 1,94 %  | histidine        | 0,93 % |
| ammoniac         | 12,98 % |                  |        |

35

(b) sucres ( $\pm 0,6 \%$ )

|           |          |           |         |
|-----------|----------|-----------|---------|
| arabinose | 9,38 %   | galactose | 20,98 % |
| glucose   | 64,98 %  | mannose   | 3,26 %  |
| xylose    | 1,40 % ; |           |         |

5 (10) rotation optique :

$$[\alpha]_D^{26} = +63^\circ \text{ à } +69^\circ (+66^\circ \text{ en moyenne})$$

(c = 0,49 % dans NaOH 0,1N).

2. Substance selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est sous forme effectivement pure.

10 3. Procédé de production d'une substance présentant une activité inductrice d'interféron, caractérisé en ce qu'on extrait ladite substance active d'une plante appartenant au groupe de plantes du genre *Carthamus* et de leurs variantes, contenant ladite substance active et que l'on récupère la substance

15 dans l'extrait.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la plante appartient au groupe *Carthamus tinctorius* Linne et de ses variantes.

20 5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la plante appartient au groupe de *Carthamus lanatus* Linne, *Carthamus arborescens* Linne, *Carthamus baeticus* Nyman et de leurs variantes.

6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on effectue l'extraction avec de l'eau.

25 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on effectue l'extraction à un pH de 7 à 10.

8. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on effectue l'extraction avec un solvant hydrophile effectivement incapable de dissoudre la substance active.

30 9. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on effectue la récupération en formant une liqueur surnageante, qu'on fractionne par ultrafiltration pour former des fractions contenant la substance active.

35 10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on effectue l'ultrafiltration en utilisant un ultrafiltre capable de retenir la substance d'un poids moléculaire supérieur à 100.000.

881595

11. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on effectue la récupération en formant une liqueur sur-nageante à laquelle on ajoute un solvant organique hydrophile effectivement incapable de dissoudre la substance active, pour  
5 obtenir des fractions contenant la substance active.

12. Substance présentant une activité d'interféron, caractérisée en ce qu'elle est produite par un procédé selon les revendications 3 à 11.

13. Composition pharmaceutique caractérisée en ce  
10 qu'elle comprend, comme ingrédient actif, un inducteur d'interféron selon l'une des revendications 1 à 11, en association avec une substance porteuse ou un excipient, pharmaceutiquement acceptables.

Bruxelles, le 7 février 1980.  
P. Pon. Société dite :  
THE KITASATO INSTITUTE.



L 14.

Consultant:

**POL HANSENS**  
Ingénieur des Arts et Métiers  
E.C.A.M. BR. - I.C.F.

Conseils en Brevets:  
agréés près l'Office Européen  
des Brevets

**J. KUBORN**  
I.C.E. (Electron.) Lg  
**J. L. PRIGNOT**  
Ing. Techn. E.C.A.M.

Annuités **F. DEKON**

Marques **M. R. MONSEU**

Votre Réf.

Notre Réf. B 15516/OP.

Le 12 mars 1980.

# OFFICE HANSENS

S.P.R.L

Société de personnes à responsabilité limitée

Square Marie-Louise, 40 - Ette 19. B 1040 BRUXELLES (Belgique)

**BREVETS - MARQUES - MODELES**

|                                         |  |
|-----------------------------------------|--|
| LE MINISTRE DES AFFAIRES<br>ECONOMIQUES |  |
| 12-3-1980                               |  |
| ENTRÉE                                  |  |

MINISTRE DES AFFAIRES  
ECONOMIQUES,  
Rue Demot, 24-26,  
1040-BRUXELLES.

881515

2<sup>e</sup>  
115.172

Demande de brevet BELGE N° PV 0/199303 du 7 février 1980  
THE KITASATO INSTITUTE.

Messieurs,

La présente a pour but de rectifier une erreur matérielle commise dans l'exécution de la spécification du brevet sous rubrique.

Au tableau IV, page 8, dans la première colonne, sous le titre

"Durée de chauffage (heure)"

à la suite d'une erreur de dactylographie, il a été repris les mêmes valeurs qu'au tableau III, page 7, sous le titre "Température de chauffage (°C)".

En fait, la première colonne du tableau IV devrait se lire :

Non traité

1

4

8

24.

La matérialité de cette erreur apparaît immédiatement des demandes de brevets 0/198922 du 10 janvier 1980 et 0/198300 du 27 novembre 1979, au nom de la même déposante, et relatives au même secteur technique. En effet, respectivement aux pages 8 et 7 de ces demandes de brevets, des tableaux 4 analogues, analysant le même genre de résultats, mentionnent correctement des temps de chauffage suivant le libellé ci-dessus.

.../...

Téléphone: (02) 230 79 83

Telex: 23888 offens b

T. V. A.: 415.988.979

R. C. B. 397.784

Société Générale de Banque: 210-0558860-85

Chèques Postaux: 000-1166598-78

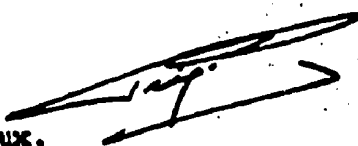
Le soussigné n'ignore pas qu'aucun document joint au dossier d'un brevet d'invention ne peut être de nature à apporter, soit à la description, soit aux dessins, des modifications de fond et déclare que le contenu de cette note n'apporte pas de telles modifications et n'a d'autre objet que de signaler une ou plusieurs erreurs matérielles.

Il reconnaît que le contenu de cette note ne peut avoir pour effet de rendre valable, totalement ou partiellement, le brevet N°0/199303 si celui-ci ne l'était pas en tout ou en partie, en vertu de la législation actuellement en vigueur.

Il autorise l'administration à joindre cette note au dossier du brevet et à en délivrer photocopie.

A vous lire, nous vous prions d'agréer, Monsieur le Ministre, l'assurance de notre considération distinguée.

Annexe : 100 frs. en timbres fiscaux.

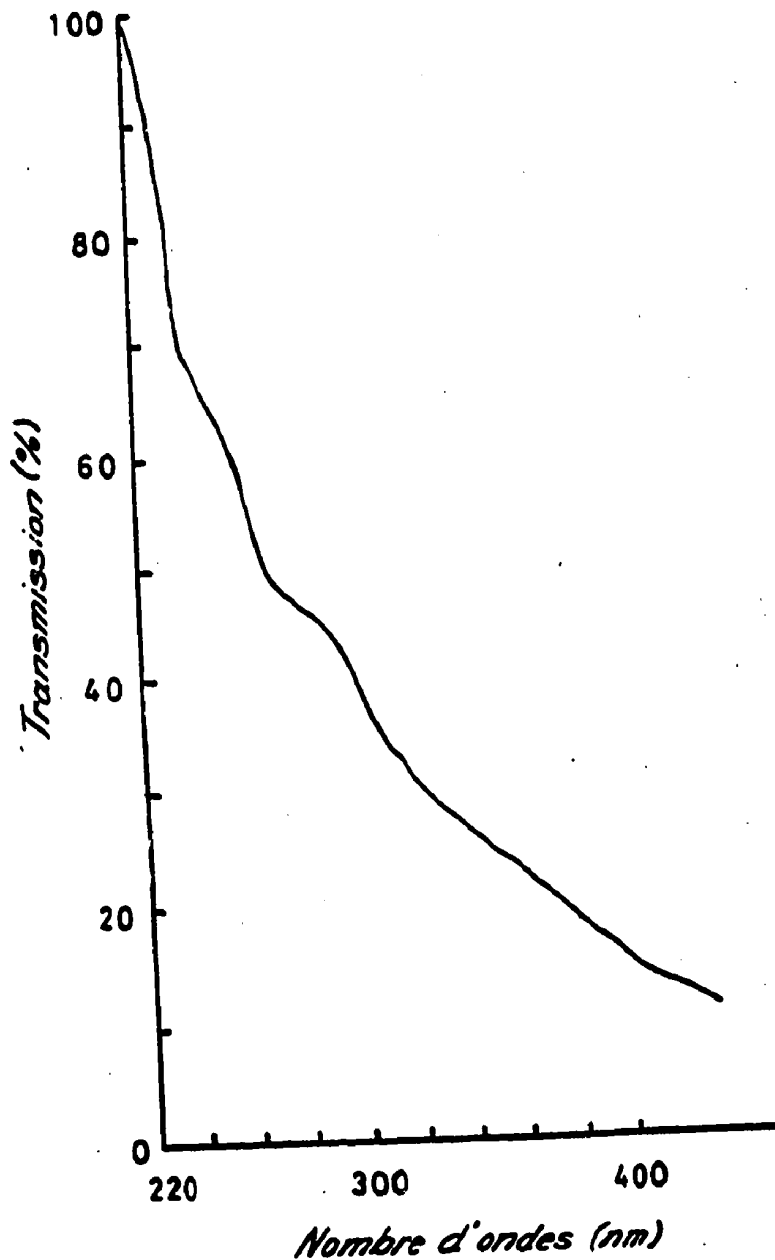


NOTE JOINTE AU DOSSIER  
DU BREVET

N° 881535 Le 18-03-1980

D.

FIG. 1

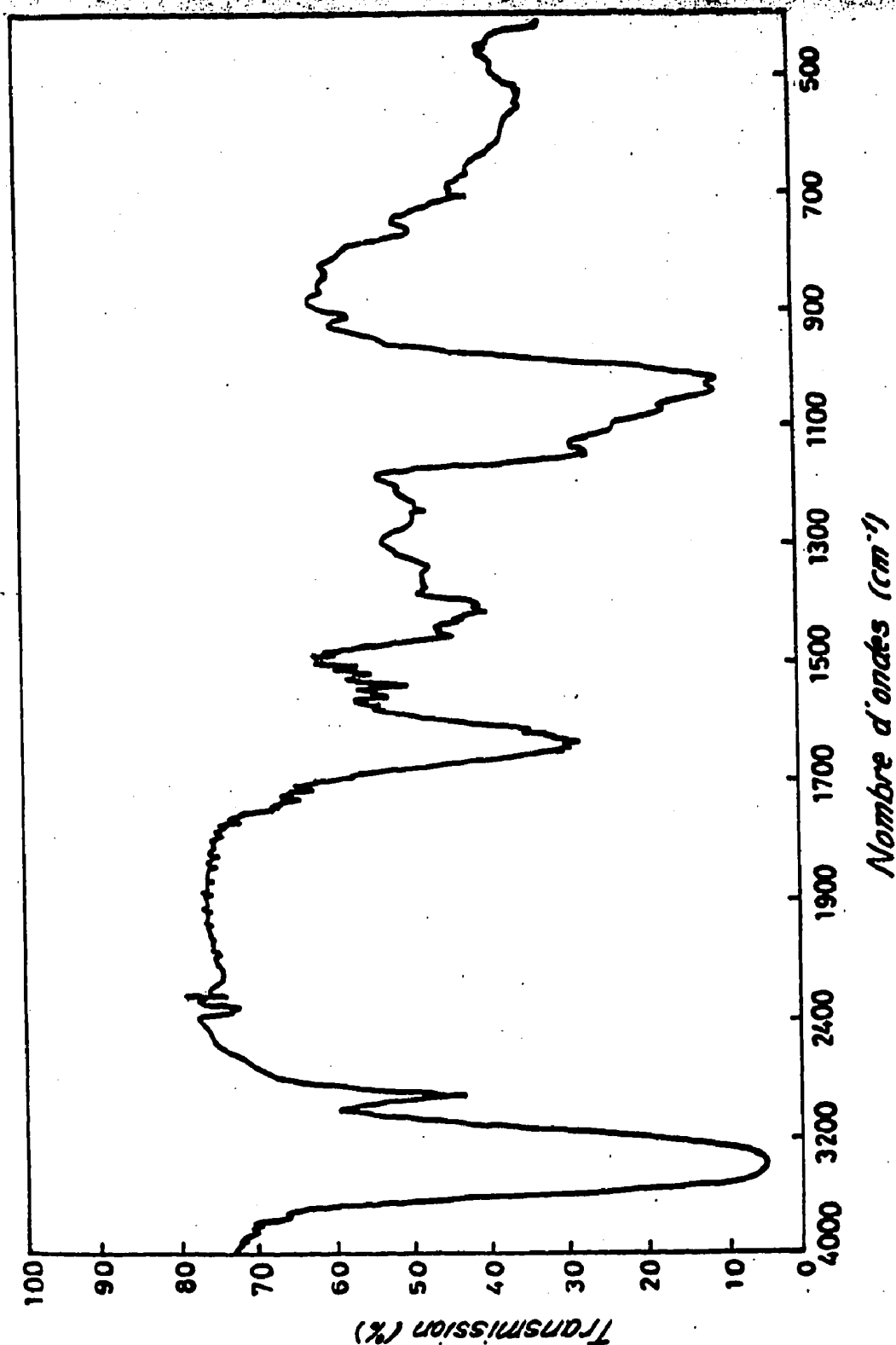


Bruxelles, le 7 février 1980.  
P. Pon. Société dite :  
THE KITASATO INSTITUTE.

*[Signature]*

0154

FIG. 2



Bruxelles, le 7 février 1980.  
P. Pon. Société dite :  
THE KITASATO INSTITUTE.

*[Handwritten signature]*