

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

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

2 460 305

A2

**DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION**

(21)

N° 79 16966

Se référant : au brevet d'invention n° 77 02396 du 28 janvier 1977.

(54)

Procédé de préparation d'un concentré de Facteur VIII.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 G 7/00 // A 61 K 37/04.

(22)

Date de dépôt..... 29 juin 1979, à 15 h 51 mn.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 4 du 23-1-1981.

(71)

Déposant : INSTITUT MERIEUX, SA, résidant en France.

(72)

Invention de :

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Michel Nony, Conseil en brevets d'invention,
29, rue Cambacérès, 75008 Paris.

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

Dans la demande de brevet principal on a décrit et revendiqué un procédé de préparation d'un concentré de Facteur VIII caractérisé par le fait qu'il comprend l'étape consistant à maintenir une solution tampon contenant le Facteur VIII, et
5 environ 6% de polyol, à une température d'environ 0 à 5°C jusqu'à ce que la précipitation se produise.

Le précipité obtenu est constitué par du Facteur VIII ou Facteur anti-hémophilique, également appelé AHF, concentré et purifié.

10 Selon un mode d'exécution particulier, également décrit et revendiqué dans la demande de brevet principal, ce procédé était précédé d'une étape consistant à utiliser comme produit de départ une solution de plasma ou de cryoprécipité de plasma et à ajouter environ 4% de polyol à ladite solution, à éliminer le
15 précipité de fibrinogène résultant, et à utiliser le surnageant comme produit de départ dans le procédé mentionné ci-dessus.

Cette étape préliminaire était effectuée à température d'environ 20 à 30°C.

Il a maintenant été découvert que cette étape préli-
20 minaire de purification peut être remplacée par une autre étape préliminaire qui consiste à traiter une solution de Facteur VIII à purifier avec une faible quantité de polyol correspondant à une concentration inférieure à 4%, en refroidissant à une température inférieure à 15°C. On élimine ainsi par précipitation la majeure
25 partie du fibrinogène ainsi que d'autres impuretés telles que par exemple les globulines insolubles à froid (cold insoluble globulins ou C.I.G.). En opérant ainsi à basse température, on obtient une purification au moins aussi bonne qu'avec le procédé à température ambiante du brevet principal, tout en utilisant une
30 quantité moindre de polyol.

Selon des modes d'exécution préférés, cette étape préliminaire peut encore être caractérisée par les points suivants, pris isolément ou en combinaison.

Le produit de départ, tel que ceux mentionnés dans la
35 demande de brevet principal, est mis sous la forme d'une solution tampon contenant le Facteur VIII à purifier; le produit de départ est par exemple une solution tampon de cryoprécipité ou une solution plasmatique contenant du Facteur VIII. Les impuretés présentes dans le produit de départ sont notamment le fibrinogène
40 et les C.I.G.

Ladite solution de départ est tamponnée à pH compris entre 6 et 7, et de préférence de 6,0 à 6,5.

On ajoute le polyol, de préférence jusqu'à une concentration de 1 à 3% environ.

5 D'une façon générale, les indications de concentrations, dans la présente demande, sont en poids/volume.

Le polyol peut être par exemple du polyéthylèneglycol, de préférence du polyéthylèneglycol 4000.

10 Comme exemple d'autres polyols utilisables, on citera en particulier des polymères séquencés du type polyoxyéthylène-polyoxypropylène-polyoxyéthylène tels que celui commercialisé sous la dénomination Pluronic F-68.

On refroidit à température comprise entre 0,5 et 15°C, généralement entre +1 et +5°C environ, et en particulier entre 2 15 et 4°C environ.

On agite pendant un temps pouvant varier de 5 minutes à 3 heures, de préférence pendant une heure environ, en maintenant le refroidissement pour conserver la température choisie, après quoi on centrifuge toujours en refroidissant à température inférieure à 15°C, et de préférence entre +1 et +5°C, comme indiqué précédemment.

On élimine le précipité formé et utilise le surnageant comme produit de départ du procédé décrit à la revendication 1 de la demande de brevet principal.

25 L'exemple suivant illustre l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE

On utilise comme produit de départ du cryoprécipité (487g) que l'on dissout dans 1920ml d'une solution tampon constituée par une solution aqueuse de citrate de trisodium 0,02M et de glycine 0,1M, de pH 6,9.

Après dissolution complète, on ajuste le pH à 6,4 par l'acide citrique, ajoute du PEG 4000 à une concentration de 3% (38,4g). On refroidit à +2°C et agite pendant une heure. On centrifuge en maintenant la température à +2°C. On élimine le précipité et recueille le surnageant (1670ml).

On traite alors ce surnageant selon le procédé de la demande de brevet principal. Pour cela, on ajuste le pH du surnageant à 6,9 par addition de NaOH, puis ajoute 68g de PEG (6%) toujours à +2°C. Après agitation jusqu'à fin de précipitation, on

centrifuge à +2°C et recueille le précipité (14g) de Facteur VIII purifié.

On redissout le précipité dans 400ml d'une solution tampon citrate-glycine, ajuste le pH à 6,9 et soumet la solution
5 à une filtration stérilisante à travers des filtres à membranes micropores ayant par exemple des pores d'un diamètre de 1,2-0,65-0,45 et 0,3 microns.

La solution stérile de Facteur VIII purifié obtenue est lyophilisée de manière usuelle.

RE V E N D I C A T I O N S

1. Procédé de préparation d'un concentré de Facteur VIII, selon la demande de brevet principal, comprenant l'étape consistant à maintenir une solution tampon contenant du Facteur
5 VIII et environ 6% de polyol à une température d'environ 0 à 5°C jusqu'à ce que la précipitation se produise, caractérisé par le fait qu'il comprend l'étape préliminaire consistant à traiter une solution de Facteur VIII à purifier avec une faible quantité de polyol correspondant à une concentration inférieure à 4%, en
10 refroidissant à une température inférieure à 15°C, et à éliminer le précipité formé.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la solution de départ est une solution tampon de pH compris entre 6 et 7 environ.
- 15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que ledit pH est de 6,0-6,5.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on ajoute ledit polyol jusqu'à une concentration de 1 à 3% environ.
- 20 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on refroidit à température comprise entre 0,5 et 15°C.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'on refroidit entre +1 et +5°C.
- 25 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que l'on refroidit entre 2 et 4°C environ.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on agite pendant un temps pouvant varier de 5 minutes à 3 heures, et en particulier
30 pendant une heure environ, en maintenant le refroidissement pour conserver la température choisie.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que ledit polyol est du polyéthylèneglycol.
- 35 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que le polyéthylèneglycol est du polyéthylèneglycol 4000.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé par le fait que ledit polyol est un polymère séquencé du type polyoxyéthylène-polyoxypropylène-polyoxyéthylène.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le fait que ledit polyol est celui commercialisé sous la dénomination Pluronic F-68.