(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
18 décembre 2014 (18.12.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/198735 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 38/36 (2006.01) *C12N 9/64* (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) *A61P 7/04* (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2014/062051

(22) Date de dépôt international :
10 juin 2014 (10.06.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR 13/55403 11 juin 2013 (11.06.2013) FR

(71) Déposant : **LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES** [FR/FR]; ZA de Courtaboeuf, 3 avenue des tropiques, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeur : **CHEVREUX, Guillaume**; 66 Rue des Martyrs, F-75009 Paris (FR).

(74) Mandataire : **HIRSCH & ASSOCIES**; 58, Avenue Marceau, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

WO 2014/198735 A1

(54) **Title** : TRANSGENIC FACTOR VII HAVING A SPECIFIC N-GLYCOSYLATION AND SUBSTANTIALLY HOMOGENOUS ISOELECTRIC POINT

(54) **Titre** : FACTEUR VII TRANSGÉNIQUE PRESENTANT UNE N-GLYCOSYLATION SPÉCIFIQUE ET POINT ISOELECTRIQUE SUBSTANTIELLEMENT HOMOGENE

(57) **Abstract** : The present invention relates to a factor VII composition having a substantially homogenous isoelectric point and a method for formulating such a composition. The present invention also relates to the therapeutic use of a factor VII composition having a substantially homogenous isoelectric point.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne une composition de facteur VII présentant un point isoélectrique substantiellement homogène et un procédé de formulation d'une telle composition. La présente invention concerne également l'utilisation thérapeutique d'une composition de facteur VII présentant un point isoélectrique substantiellement homogène.

FACTEUR VII TRANSGÉNIQUE PRESENTANT UNE N-GLYCOSYLATION SPÉCIFIQUE ET POINT ISOELECTRIQUE SUBSTANTIELLEMENT HOMOGENE

Domaine technique

La présente invention concerne une composition de facteur VII présentant un point isoélectrique substantiellement homogène et un procédé de formulation d'une telle composition. La présente invention concerne également l'utilisation thérapeutique d'une composition de facteur VII présentant un point isoélectrique substantiellement homogène.

Arrière-plan technologique

Le Facteur VII (FVII) est une glycoprotéine dépendante de la vitamine K qui intervient dans la voie extrinsèque de la coagulation sanguine. Sous sa forme activée (FVIIa), le facteur VIIa participe au processus de coagulation en se complexant au facteur tissulaire (FT) et en activant le facteur X et le facteur IX en facteur Xa et IXa, respectivement. Le FVIIa possède en outre la capacité de déclencher la coagulation du sang lorsque la cascade de réactions conduisant à la coagulation sanguine est interrompue ou déficiente, par exemple en l'absence de facteur VIII ou IX. C'est pourquoi le facteur VII est utilisé depuis longtemps en tant que médicament pour le traitement de certains troubles de la coagulation sanguine se manifestant par des saignements, et notamment pour traiter les patients présentant un déficit en facteur VIII (hémophilie de type A) ou en facteur IX (hémophilie de type B) et présentant des inhibiteurs contre ces facteurs, pour traiter les patients présentant un déficit congénital en facteur VII, ou en tant que produit pour la prévention des hémorragies susceptibles de se produire lors d'opérations chirurgicales.

Le facteur VII est sécrété sous la forme d'une chaîne peptidique unique de 406 résidus, d'un poids moléculaire d'environ 50 kDa, laquelle est coupée au niveau de la liaison Arg_{152}-Ile_{153} (Arginine 152- Isoleucine 153) lors de son activation en FVIIa. Le Facteur VIIa qui en résulte se compose donc d'une chaîne légère de 152 acides aminés, d'un poids moléculaire d'environ 20 kDa, et d'une chaîne lourde de 254 acides aminés, d'un poids moléculaire d'environ 30 kDa, liées entre elles par un seul pont disulfure (Cys_{135} - Cys_{262}). Quatre domaines structuraux distincts peuvent être identifiés dans la séquence du facteur VII: un domaine γ-carboxylique N-terminal (domaine Gla), deux domaines "epidermal growth factor (EGF)-like", ainsi qu'un domaine sérine protéase.

Le Facteur VIIa plasmatique comporte par ailleurs plusieurs modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles : la γ-carboxylation des dix premiers acides glutamiques de sa séquence, l'hydroxylation partielle de l'acide aspartique 63, la O-glycosylation des sérines 52 et 60 (Ser_{52} et Ser_{60}) et la N-glycosylation des asparagines 145 et 322 (Asn_{145} et Asn_{322}) (Fenaille F. et al., Mass spectrometric characterization of N- and O-glycans of plasma-derived coagulation factor VII. Glycoconj. J. 25.9 (2008): 827-42).

L'activité biologique du facteur VII dépend ainsi fortement de la nature et de la proportion des structures oligosaccharidiques qui sont attachées à la protéine, et qui peuvent affecter de nombreux aspects de l'efficacité thérapeutique tels que, par exemple, la solubilité, la résistance aux attaques protéolytiques, l'inactivation thermique, l'immunogénicité, la demi-vie, la bioactivité, la biodisponibilité et la stabilité du facteur VII.

Il apparait que ces modifications post-traductionnelles, qui varient souvent d'une molécule de facteur VII plasmatique à une autre, conduisent à une certaine hétérogénéité des molécules présentes dans les compositions pharmaceutiques de facteur VII. Une telle hétérogénéité présente notamment l'inconvénient de compliquer les étapes de formulation du facteur VII en vue de la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement des patients. En effet, il est fréquent qu'une proportion significative des molécules de facteur VII purifiées précipite lors de l'étape de formulation : il en résulte une perte de matière première active, ainsi que la présence de facteur VII devenu inactif dans les compositions pharmaceutiques destinées au traitement thérapeutique.

En raison des nombreux désavantages de l'utilisation de plasma humain (risques de contamination virale, difficulté de purification, approvisionnement, ...) en tant que source de produits pharmaceutiques, il est maintenant préféré de produire le facteur VII dans des systèmes recombinants ou transgéniques. Toutefois, dans la mesure où la glycosylation est une modification post-traductionnelle complexe qui dépend directement du système cellulaire utilisé, la production à grande échelle de protéines dans des cellules hétérologues conduit souvent à la production de polypeptides ayant une structure primaire identique, mais possédant des structures oligosaccharidiques variables.

C'est par exemple le cas du NovoSeven®, un médicament autorisé sur le marché européen depuis 1996 et autorisé sur le marché américain en 1999, produit par la firme danoise NovoNordisk, dont le principe actif est l'eptacog alfa (facteur VII activé de la coagulation recombinant humain produit par génie génétique à partir de cellules rénales BHK de hamsters nouveau-nés).

C'est également le cas, pour le FVII recombinant ou transgénique décrit dans la demande EP 2 037 955 A, déposée le 31 mai 2007 par LFB Biotechnologies.

Il apparait ainsi que, pour ces facteurs VII recombinants, l'hétérogénéité des modifications post-traductionnelles portées par les molécules de Facteur VII perturbent l'étape de formulation et contribuent à diminuer la stabilité et/ou l'activité spécifique des produits pharmaceutiques finaux, en favorisant la présence de molécules précipitées de facteur VII. Il en résulte de nombreuses difficultés pour parvenir à la préparation de compositions pharmaceutiquement acceptables présentant une efficacité clinique uniforme et prédéterminée.

Il existe par conséquent un besoin croissant pour des compositions de facteur VII présentant une stabilité chimique et physique améliorée à température ambiante et capables de faciliter et d'améliorer le rendement de l'étape de formulation visant à préparer des compositions pharmaceutiques destinées au traitement des patients atteints d'hémophilie avec inhibiteurs ou de déficit congénital en facteur VII.

Résumé de l'invention

La demanderesse a découvert de manière surprenante que des compositions de facteur VII dont les molécules de facteur VII présentent un point isoélectrique substantiellement homogène facilitent l'étape de formulation à un pH optimal, de préférence à un pH optimal de 6,0±0,2, des compositions pharmaceutiques en évitant la précipitation du facteur VII.

La présente invention concerne donc une composition de facteur VII dans laquelle les molécules de facteur VII présentent un point isoélectrique substantiellement homogène.

Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention concerne une composition de facteur VII dans laquelle, parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la

composition, au moins 60 % desdites formes N-glycanniques sont monochargées, et parmi toutes les molécules de facteur VII de la composition, au moins 80% desdites molécules présentent une γ-carboxylation sur 9 résidus d'acide glutamique.

Dans un mode de réalisation particulier, au moins 65%, de préférence au moins 70%, ou de préférence au moins 80% des formes N-glycanniques du facteur VII de la composition sont monochargées.

Dans un mode de réalisation particulier, au moins 85%, de préférence de 85% à 100%, ou de préférence de 90% à 100%, ou de préférence de 95% à 100% des molécules de facteur VII de la composition présentent une γ-carboxylation sur 9 résidus d'acide glutamique.

Dans un mode de réalisation particulier, le taux de γ-carboxylation de la composition de facteur VII de l'invention sur le résidu d'acide glutamique 35 (Glu35 par rapport à la séquence du facteur VII plasmatique) est inférieur à 20%, ou de préférence inférieur à 15%, ou encore de préférence inférieur à 10%, de préférence inférieur à 5%.

Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention concerne une composition de facteur VII, dans laquelle au moins 60% des formes N-glycanniques des facteurs VII de la composition sont complexes monosialylées.
Dans un mode de réalisation particulier, au moins 10%, de préférence au moins 15%, ou de préférence au moins 20%, ou de préférence au moins 25% des formes N-glycanniques des facteurs VII de la composition sont high Mannose/ hybride.

Dans un mode de réalisation particulier, au moins 90%, de préférence au moins 95% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieur à 1,2.
Dans un mode de réalisation particulier, au moins 50%, ou de préférence au moins 55%, ou de préférence 60% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieur à 1 ; de préférence inférieur à 0,5 ; ou de préférence inférieur à 0,4.

Dans un autre mode de réalisation particulier, le facteur VII de l'invention est un facteur VII recombinant ou transgénique. De manière préférée, le facteur VII de la composition est

produit par des lapines transgéniques. Dans un mode de réalisation, le facteur VII de la composition est un facteur VII activé.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de la composition de facteur VII pour le traitement d'épisodes hémorragiques et pour la prévention des hémorragies survenant lors d'interventions chirurgicales ou de procédures invasives chez les groupes de patients suivants :

- chez des patients atteints d'une hémophilie congénitale avec inhibiteurs dirigés contre les facteurs de coagulation VIII ou IX (hémophilie A ou B),
- chez des patients atteints d'une hémophilie congénitale chez lesquels une forte réponse anamnestique à l'administration de facteur VIII ou de facteur IX est prévisible,
- chez des patients atteints d'une hémophilie acquise,
- et/ou chez des patients ayant un déficit congénital en FVII.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé d'obtention d'une composition de facteur VII selon l'invention comprenant les étapes suivantes :

(a) l'insertion d'une séquence d'ADN comprenant un gène codant pour le facteur VII dans un embryon de mammifère non-humain, ledit gène étant sous le contrôle transcriptionnel du promoteur béta-caséine,

(b) le transfert d'embryons obtenus à l'étape a) dans l'oviducte d'une femelle de mammifère non-humain de manière à ce qu'il se développe en un mammifère adulte non humain,

(c) l'induction de la lactation chez le mammifère non-humain adulte obtenu à l'étape b) de type femelle ou dans un descendant femelle de ce mammifère non-humain dans lequel le gène et le promoteur sont présents dans son génome,

(d) la collection du lait dudit mammifère non-humain, et

(e) la purification du facteur VII présent dans le lait collecté.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de formulation d'une composition de facteur VII comprenant le mélange de la composition de facteur VII selon l'invention avec une solution tampon, l'ajustement du pH si nécessaire, filtration puis dessication si nécessaire pour obtenir la forme solide.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée qui suit et du mode de réalisation préféré de l'invention, donnée à titre d'exemple et en référence aux figures annexées.

Légende des figures

Figure 1 : Procédé de purification et d'extraction du facteur VII de l'invention.

Figure 2 : Spectre de masse des peptides N-terminaux [Ala_1-Arg_{36}] et [Ala_1-Lys_{32}] du facteur VII de l'invention.

Figure 3 : Profilage de charge des formes N-glycanniques du facteur VII de l'invention obtenu par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance ayant une résine échangeuse d'anions couplée à une détection par fluorescence (« AEX-UPLC/FD »)

Figure 4 : Comparaison des points isoélectriques du facteur VII de l'invention et d'un facteur VII recombinant (Novoseven®) obtenu par la méthode de focalisation isoélectrique (« IEF »).

Figure 5 : Profilage de charge des formes N-glycanniques du facteur VII de l'invention, du facteur VII issu de la demande WO2007/138199 et d'un facteur VII recombinant (Novoseven®) obtenu par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance ayant une résine échangeuse d'anions couplée à une détection par fluorescence (« AEX-UPLC/FD »)

Figure 6 : Vecteur d'expression utilisé pour la génération de mammifères non humain exprimant du FVII recombinant humain selon l'invention.

Description détaillée

La composition de facteur VII, stable chimiquement et physiquement à température ambiante et facile à formuler selon la présente invention se caractérise en ce que les molécules de facteur VII qui la composent présentent un point isoélectrique substantiellement homogène.

Avantageusement, la composition de facteur VII selon l'invention comprend des molécules de facteur VII, dans laquelle les molécules de facteur VII présentent un point isoélectrique substantiellement homogène.

Par « facteur VII » ou « FVII », il est entendu les polypeptides comprenant la séquence 1-406 du facteur VII humain de type sauvage (comme décrit, par exemple, dans le brevet US 4,784,950 A de ZymoGenetics Inc.), ou du facteur VII dérivé d'une autre espèce (par exemple bovin, porcin, lapin, caprin, murin). Il comprend en outre les variations alléliques naturelles du facteur VII qui peuvent exister. Le terme « facteur VII » inclut aussi les variants du FVII qui présentent la même activité ou une activité biologique supérieure par rapport à l'activité de la forme sauvage, ces variants incluant notamment les polypeptides différant du FVII sauvage par insertion, délétion ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés.

Le terme « facteur VII » ou « FVII » comprend également le facteur VII non clivé (zymogène) et le facteur VII activé (« facteur VIIa » ou « FVIIa »). Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le facteur VII utilisé dans la composition selon l'invention est de préférence activé.

Par l'expression « activité biologique du facteur VIIa », il est entendu la capacité du FVIIa à générer de la thrombine, par exemple à la surface des plaquettes activées. L'activité du facteur VII dans la composition selon l'invention peut être évaluée de différentes manières. L'activité biologique du FVIIa peut par exemple être quantifiée en mesurant la capacité d'une composition de FVII à promouvoir la coagulation du sang en utilisant un plasma déficient en FVII et en thromboplastine, comme décrit par exemple dans le brevet US No. 5,997,864. Dans cet essai, l'activité biologique est évaluée par rapport à un échantillon témoin et est converti en « unités de FVII » par comparaison avec un sérum humain standard poolé contenant 1 unité/ml d'activité de Facteur VII. Alternativement, l'activité biologique du facteur VII peut être quantifiée par (i) la mesure de la capacité du Facteur VIIa à produire du facteur Xa dans un système comprenant du FT englobé dans une membrane lipidique et du Facteur X (Persson et al. J. Biol. Chem. 272 :19919-19924, 1997) ; (ii) en mesurant l'hydrolyse du facteur X dans un système aqueux (voir « Méthodes générales » plus bas) ; (iii) en mesurant la liaison physique du FVIIa au FT par l'intermédiaire de la résonance plasmon de surface (Persson , FEBS letts, 413 :359-363, 1997), (iv) en mesurant l'hydrolyse d'un substrat synthétique ou (v) en mesurant la génération de thrombine dans un système *in vitro* indépendant du FT.

Dans un mode de réalisation particulier, le facteur VII de l'invention est un facteur VII recombinant. Par « facteur VII recombinant », il est entendu tout facteur VII issu du génie génétique et résultant de l'expression du gène correspondant dans tout microorganisme, plante, plante transgénique, animal ou animal transgénique. Par microorganisme, il est entendu tout système bactérien, fongique, viral ou cellulaire. Le facteur VII recombinant peut également être produit à partir de cellules eucaryotes en culture telles que des cellules de plante ou de mammifère, par exemple des cellules animales ou humaines. Ainsi, le FVII de l'invention est issu de la transcription puis de la traduction d'une molécule d'ADN codant pour le FVII dans un hôte cellulaire. Le FVII recombinant de l'invention peut être obtenu au moyen de techniques standards, bien connues de l'homme du métier, permettant l'expression d'une protéine dans un système biologique.

Plus particulièrement, on entend par « FVII recombinant » tout FVII obtenu par recombinaison génétique et exprimé par une lignée cellulaire mise en culture. A titre d'exemple, on peut citer les lignées suivantes : BHK (Baby. Hamster Kidney) et notamment BHK tk^{ts}13 (CRL 10314, Waechter and Baserga, Proc. Natl . Acad. Sci. USA 79:1106-1110, 1982), CHO (ATCC CCL 61), COS-I (ATCC CRL 1650), HEK293 (ATCC CRL 1573; Graham et al, J. Gen. Virol . 36:59-72, 1977), Rat Hep I (Rat hepatoma; ATCC CRL 1600) , Rat Hep II (Rat hepatoma; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), Human lung (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1) and DUKX cells (CHO cell line) (Urlaub and Chasin, Proc. Natl . Acad. Sci . USA 77:4216-4220, 1980), cellules 3T3 , cellules Namalwa, ou des cellules BHK adaptées à la culture sans sérum (Document US 6,903,069).

Dans un mode de réalisation particulier, la lignée cellulaire est modifiée de manière à ce qu'elle produise des compositions selon l'invention, par exemple en modulant l'expression d'une glycosyltransférase, en particulier en sur-exprimant une sialyltransférase.

Dans un mode de réalisation particulier, le facteur VII de l'invention est un facteur VII transgénique. Par « facteur VII transgénique », il est entendu tout facteur VII recombinant obtenu à partir d'un animal transgénique.

Par « animal transgénique », il est entendu tout animal non-humain présentant une modification de son génome destinée à permettre l'expression du facteur VII selon

l'invention. La modification du génome résulte avantageusement d'une altération, d'une modification ou de l'insertion d'un gène. Cette modification peut être due à l'action d'agents altérants ou mutagènes classiques ou bien effectuée par mutagenèse dirigée. La modification du génome peut également résulter d'une insertion de gène(s) ou de remplacement de gène(s) dans sa (leur) forme sauvage ou mutée. Dans un mode de réalisation préféré, le facteur VII de la présente invention est obtenu à partir du lait d'un animal transgénique. Un animal transgénique selon l'invention peut être choisi parmi le lapin, la chèvre, la vache, le chameau, le hamster, la souris, le rat, le cheval, la truie, le dromadaire, la brebis, le lama, la liste n'étant pas limitative. De préférence, le facteur VII de la présente invention est obtenu à partir du lait de lapines transgéniques. La sécrétion de facteur VII par les glandes mammaires, permettant sa sécrétion dans le lait du mammifère transgénique, implique le contrôle de l'expression du facteur VII de manière tissus-dépendante. De telles méthodes de contrôle sont bien connues de l'homme du métier. Le contrôle de l'expression est effectué grâce à des séquences permettant l'expression de la protéine vers un tissu particulier. Il s'agit notamment des séquences promotrices WAP, béta-caséine, béta-lactoglobuline et des séquences peptides signal, la liste n'étant pas limitative. De manière particulièrement avantageuse, l'expression dans les glandes mammaires de la lapine est effectuée sous le contrôle du promoteur de la béta-caséine bien connu de l'homme du métier.

Une méthode de production d'une protéine recombinante dans le lait d'un animal transgénique peut comporter les étapes suivantes : une molécule d'ADN synthétique comprenant un gène codant pour le FVII humain, ce gène étant sous le contrôle d'un promoteur d'une protéine sécrétée naturellement dans le lait, est intégrée dans un embryon d'un mammifère non humain. L'embryon est ensuite placé dans une femelle de mammifère de la même espèce. Une fois que le mammifère issu de l'embryon s'est suffisamment développé, la lactation du mammifère est induite, puis le lait collecté. Le lait contient alors le FVII d'intérêt sécrété par l'animal transgénique.

Un exemple de préparation de protéine dans le lait d'une femelle de mammifère autre que l'être humain est donné dans la demande EP 0 527 063 B1 (Institut National de la Recherche Agronomique), dont l'enseignement peut être repris pour la production du facteur VII de l'invention.

Dans un mode de réalisation préféré, le facteur VII selon l'invention est produit dans le lait de lapines transgéniques. En particulier, un plasmide contenant le promoteur béta-

caséine est fabriqué par introduction d'une séquence comportant le promoteur du gène béta-caséine, ce plasmide étant réalisé de manière à pouvoir recevoir un gène étranger placé sous la dépendance de ce promoteur. Le gène codant pour le FVII humain est intégré, et placé sous la dépendance du promoteur béta-caséine. Le plasmide contenant le promoteur et la séquence codant pour la protéine d'intérêt est digéré par des enzymes de restriction pour libérer le fragment d'ADN contenant le promoteur béta-caséine et la séquence de FVII humain. Après purification, les fragments sont introduits, par microinjection dans le pronucléus mâle d'embryons de lapines Wild-type. Les embryons sont ensuite cultivés avant transfert dans l'oviducte de femelles Wild-type hormonalement préparées. A la mise bas de ces femelles, la descendance est évaluée par PCR pour déterminer les animaux transgéniques. Le nombre de copies du transgène et son intégrité est révélée par la technique de Southern à partir de l'ADN extrait des lapereaux transgéniques obtenus. La concentration de FVII humain exprimé dans le lait des descendants femelles transgéniques est évaluée à l'aide de tests immuno-enzymatiques.

Dans un mode de réalisation particulier, la composition de facteur VII selon l'invention est obtenue par le procédé comprenant les étapes suivantes :

(a) l'insertion d'une séquence d'ADN comprenant un gène codant pour le facteur VII dans un embryon de mammifère non-humain, ledit gène étant sous le contrôle transcriptionnel du promoteur béta-caséine,

(b) le transfert d'embryons obtenus à l'étape a) dans l'oviducte de femelles de mammifère non humain de manière à ce qu'il se développe en un mammifère adulte non humain,

(c) l'induction de la lactation chez le mammifère adulte non humain obtenu à l'étape b) de type femelle ou dans un descendant femelle de ce mammifère non humain dans lequel le gène et le promoteur sont présents dans son génome,

(d) la collection du lait dudit mammifère non humain, et

(e) la purification du FVII présent dans le lait collecté.

Dans un mode de réalisation particulier, le mammifère adulte non humain ou un descendant femelle de ce mammifère non-humain est sélectionné notamment pour sa capacité à produire des compositions de FVII selon l'invention. L'animal transgénique peut également être sélectionné selon d'autres critères comme par exemple la présence d'un seul site d'intégration du transgène et/ou l'intégrité du FVII produit.

Dans un mode de réalisation particulier, l'insertion d'une séquence d'ADN comprenant un gène codant pour le facteur VII dans un embryon de mammifère non-humain, ledit gène étant sous le contrôle transcriptionnel du promoteur béta-caséine se fait par microinjection plus particulièrement dans le pronucléus mâle d'un embryon de lapin.

Par « embryon », il est entendu le pronucléus mâle ou femelle d'un embryon de mammifère non humain, plus particulièrement de lapin, fertilisé.

Par « point isoélectrique » ou « pI », il est entendu le pH pour lequel la charge élémentaire nette de la molécule de facteur VII ou de facteur VIIa est nulle, c'est-à-dire le pH auquel la molécule est électriquement neutre (forme zwitterionique). Le point isoélectrique du facteur VII selon l'invention peut être mesuré en mettant en œuvre une technique bien connue de l'homme du métier telle que la focalisation isoélectrique ou iso-electric focusing (« IEF »). Cette technique électrophorétique permet la séparation des protéines sur la base de leur point isoélectrique. Elle consiste en une migration, induite par un courant électrique uniforme, des protéines dans un gradient de pH jusqu'à ce qu'elles atteignent un pH équivalent à leur point isoélectrique spécifique, moment auquel elles cessent de migrer puisque leur charge nette est nulle. Les gels IEF sont utilisés pour déterminer le point isoélectrique d'une protéine donnée et pour détecter les changements mineurs de celle-ci dus à des modifications post-traductionnelles comme des γ-carboxylations, des phosphorylations ou des glycosylations.

Par « substantiellement homogène », il est entendu qu'au moins 90%, de préférence au moins 95% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieure ou égale à 1,2. Dans un autre mode de réalisation de l'invention au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence 60% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieure à 1 ; de préférence inférieure à 0,5. Dans un autre mode de réalisation préféré, au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence 60% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH de 0,4.

Par « formes N-glycanniques », il est entendu l'ensemble des formes N-glycanniques présentes sur les deux sites de N-glycosylation du facteur VII de l'invention.

Les formes N-glycanniques sont dite monochargées, si leur charge totale est égale à 1. Au sens de la présente invention, par « charge », il est entendu un groupement phosphate, un groupement sulfate ou une molécule d'acide sialique. Ainsi les formes N-glycanniques sont dites monochargées, si elles contiennent uniquement un groupement phosphate ou un groupement sulfate ou une molécule d'acide sialique. Par opposition au terme « monochargée », le terme « bichargée » signifie que la charge totale portée par les formes N-glycanniques est égale à 2, c'est-à-dire qu'elles présentent deux charges choisies parmi un groupement phosphate, un groupement sulfate et/ou une molécule d'acide sialique. En d'autres termes, les formes N-glycanniques bichargées possèdent une molécule d'acide sialique et un groupement phosphate, ou une molécule d'acide sialique et un groupement sulfate, ou deux molécules acides sialiques, ou deux groupements phosphates, ou deux groupements sulfates, ou un groupement phosphate et un groupement sulfate. Le terme « neutre » quant à lui signifie que les formes N-glycanniques ne contiennent aucune charge.

La charge des formes N-glycanniques du facteur VII selon l'invention peut être mesurée en mettant en œuvre une technique bien connue de l'homme du métier, notamment par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance ayant une résine échangeuse d'anions couplée à une détection par fluorescence (AEX-UPLC/FD). Cette méthode permet de séparer les différentes formes N-glycanniques en fonction de leur charge apparente (voir en particulier, Hermentin et al, Glycobiology, vol.6, no. 2, 1996). Dans le cadre d'une chromatographie échangeuse d'anions, une résine chargée positivement est utilisée comme phase stationnaire. Ces résines chargées positivement sont généralement constituées d'un polymère réticulé ou gel, sur lequel des groupements chargés positivement sont greffés. Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, une colonne échangeuse d'anions faible de type aminopropyl est utilisée.

La demanderesse a plus particulièrement mis en évidence que le point isoélectrique substantiellement homogène de la composition de facteur VII selon l'invention résulte de la combinaison des propriétés de glycosylation et de γ-carboxylation des molécules de FVII qui la composent.

Les molécules de facteur VII qui forment la composition selon l'invention comportent, similairement au facteur VII plasmatique humain, deux sites de N-glycosylation, en positions 145 et 322, et 2 sites de O-glycosylation, en positions 52 et 60. Chacun de ces

sites est susceptible de recevoir des « glycanes » ou « chaines de sucres » ou « chaines oligosaccharidiques ». Les chaines oligosaccharidiques N-glycosylées et/ou O-glycosylées portées par chaque molécule de Facteur VII de la composition sont susceptibles de différer d'une molécule à une autre. Toutefois, il est possible de mesurer la distribution de chaque motif dans la composition de facteur VII selon l'invention en employant des techniques connues de l'homme du métier.

Dans le cas de la composition de facteur VII selon l'invention, il apparait que parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la composition, au moins 60% des formes N-glycanniques , de préférence au moins 65%, de préférence au moins 70%, de préférence au moins 75%, de préférence au moins 80%, de préférence au moins 85%, de préférence au moins 90%, de préférence au moins 95%, sont monochargées. Dans un mode de réalisation préféré, les molécules de facteur VII présentant des formes N-glycanniques monochargées représentent entre 60% et 95% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 65% et 90% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 70% et 85% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 70% et 80% des molécules de facteur VII de la composition, de préférence entre 74% et 77% des molécules de facteur VII de la composition.

Dans le cas de la composition de facteur VII selon l'invention, il apparait que parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la composition, entre 3% et 10%, de préférence entre 3% et 7% des formes N-glycanniques sont neutres.

Dans le cas de la composition de facteur VII selon l'invention, il apparait que parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la composition, entre 15% et 25%, de préférence entre 18% et 22% des formes N-glycanniques sont bichargées.

Dans le cas de la composition de facteur VII selon l'invention, il apparait que parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la composition, moins de 5%, de préférence moins de 2%, de préférence moins de 1% des formes N-glycanniques sont trichargées.

Dans le cas de la composition de facteur VII selon l'invention, il apparait que parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la composition, moins de 5%, de préférence moins de 2%, de préférence moins de 1% des formes N-glycanniques sont tétrachargées.

Aux fins de l'invention, il est entendu que les pourcentages cités ci-dessus ne tiennent donc pas compte des formes glycanniques impliquées dans la O-glycosylation.

Par ailleurs, les molécules de facteur VII formant la composition de l'invention comprennent uniquement des acides sialiques liés par des liaisons de type α2-6. La Demanderesse a également constaté que la teneur en fucose du facteur VII n'avait aucun effet sur le point isoélectrique de la composition de facteur VII.

Dans le cas de la composition de facteur VII selon l'invention, il apparaît qu'au moins 60%, de préférence au moins 65%, de préférence au moins 70% des formes N-glycanniques des facteurs VII de la composition sont complexes monosialylées.
Les formes N-glycanniques complexes sont des formes bien connues de l'homme du métier (voir en particulier, Kornfeld R et al, Annual Review of Biochemistry. 1985;54:631-64. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides).
Dans un mode de réalisation particulier, au moins 10%, de préférence au moins 15%, de préférence au moins 20%, de préférence au moins 25% des formes N-glycanniques des facteurs VII de la composition sont high Mannose/ hybride.

Par « γ-carboxylation », il est entendu le produit d'une réaction biochimique visant à transformer une pluralité de résidus d'acides glutamiques présents dans la séquence peptidique du facteur VII en résidus d'acide carboxy-glutamique ou " GLA ".

Avantageusement, les molécules de facteur VII qui forment la composition selon l'invention présentent, pour au moins 80% d'entre elles, une γ-carboxylation sur neuf résidus d'acide glutamique. Dans un autre mode de réalisation, au moins 85% desdites molécules présentent une γ-carboxylation sur neuf résidus d'acide glutamique. Dans un autre mode de réalisation, entre 85% et 100%, de préférence entre 90% et 100%, de préférence entre 95% et 100% desdites molécules présentent une γ-carboxylation sur neuf résidus d'acide glutamique. Avantageusement, le taux de γ-carboxylation sur le résidu d'acide glutamique 35 (Glu 35) des molécules de facteur VII de la composition est inférieur à 20%. Dans un autre mode de réalisation, le taux de γ-carboxylation du résidu Glu35 est inférieur à 15%, de préférence inférieur à 10%, de préférence inférieur à 5%.

La demanderesse a découvert de manière surprenante que c'est la combinaison spécifique du taux des formes N-glycanniques monochargées et du taux de γ-carboxylation qui est responsable de l'homogénéité substantielle des points isoélectriques des molécules de facteur VII formant la composition selon l'invention.

La composition de FVII selon l'invention peut avantageusement être formulée sans provoquer la précipitation des molécules de FVII qui la composent. En effet, il est connu qu'au point isoélectrique d'une molécule, celle-ci s'agrège et précipite. Les molécules de facteur VII qui forment la composition selon l'invention ont un point isoélectrique compris entre 6,6 et 7,0. Il en résulte une meilleure stabilité de la composition de facteur VII selon l'invention, notamment lorsque celle-ci est formulée à un pH inférieur au point isoélectrique, et en particulier à pH 6. L'amélioration de la stabilité de la composition de facteur VII selon l'invention permet d'éviter les interactions électrostatiques responsables des phénomènes de précipitation et d'agrégation de type soluble et insoluble, ainsi que d'éviter la perte de matières premières actives et donc une baisse de rendement aboutissant à une perte de quantité en principe actif et donc potentiellement à une perte d'activité.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de purification du facteur VII activé selon l'invention.

Le lait de lapines transgéniques est obtenu à partir de la lignée de lapines transgéniques R69. Le lait de lapines transgéniques congelé est décongelé et concentré sous forme de pool de lait de lapines transgéniques.

Le pool de lait de lapines transgéniques ainsi obtenu est ensuite soumis à une étape de clarification utilisant un filtre en profondeur ayant une porosité de 0,2µm, afin d'éliminer les lipides et les composés insolubles. Le lait ainsi clarifié est ensuite soumis à une étape d'inactivation virale par traitement par un solvant de type détergent, par exemple Polysorbate 80 ou Tri-n-Butyl Phosphate à 25°C ± 2°C pendant au moins deux heures. Un tel traitement permet notamment d'inactiver efficacement les virus et en particulier, les virus de type virus non-enveloppés. Le lait clarifié et viralement inactivé est ensuite soumis à une étape de chromatographie d'affinité utilisant un ligand d'affinité spécifique du facteur VII/facteur VIIa. L'éluat de facteur VII obtenu à l'issue de cette étape de chromatographie est ensuite soumis à une étape d'ultrafiltration et de formulation, permettant ainsi d'obtenir un concentré de facteur VII intermédiaire ayant une pureté de 95%.

Le concentré de facteur VII intermédiaire est ensuite soumis à une étape de filtration utilisant un filtre ayant une porosité de 0,2µm à 0,2µm suivi d'une étape de nanofiltration sur des filtres ayant une porosité de 20nm puis 15nm. Le produit ainsi obtenu et contenant le facteur VII est ensuite soumis à une étape de chromatographie de type gel Q Sepharose XL puis à une étape de chromatographie de type CHT-I suivie d'une chromatographie de type SEC Superdex 200. Le concentré de facteur VII ainsi obtenu est ensuite soumis à une étape de stabilisation puis de filtration sur filtre ayant une porosité de 0,2µm.
Le procédé ainsi décrit permet d'obtenir un concentré de facteur VII ayant une pureté environ 99,9995%.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé de purification et d'extraction du facteur VII est celui décrit dans la demande EP12305882.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de formulation d'une composition de facteur VII activé selon l'invention.
Avantageusement, le procédé de formulation utilisé est celui décrit dans la demande WO2010/149907.

Ce procédé comprend notamment le mélange de la composition de facteur VII activé selon l'invention avec une solution tampon, l'ajustement du pH si nécessaire, la filtration et la dessication si nécessaire pour obtenir la forme solide.

Dans un mode de réalisation préféré, l'étape de mélange de la composition de facteur VII activé avec une solution tampon est mise en œuvre sur une chromatographie de type filtration sur gel. Le terme " solution tampon " inclut au moins un acide aminé hydrophile ou portant une chaîne latérale chargée positivement, et un sel de métal alcalin, un sel de métal alcalino- terreux, ou un sel d'un métal de transition. On peut notamment citer le citrate trisodique, le chlorure de calcium, ou le chlorure de zinc. De manière préférée le sel utilisé est préférentiellement du citrate de sodium ou du chlorure de calcium. Avantageusement, la solution tampon contient également au moins un acide aminé hydrophobe.

Avantageusement, la solution tampon comprend un ou plusieurs des constituants choisis parmi :

- un sel, de préférence un sel de citrate, de préférence du citrate trisodique ;

- un acide aminé ou un sel d'acide aminé hydrophile, de préférence un sel d'acide aminé hydrophile, de préférence le chlorhydrate d'arginine et/ou chlorhydrate de lysine ;

- un acide aminé ou un sel d'acide aminé hydrophobe, de préférence un acide aminé hydrophobe, de préférence l'isoleucine et/ou la glycine.

Enfin, la composition de l'invention peut comprendre un ou plusieurs détergents de type non ionique tels que les polysorbates, poloxamères, polyoxyéthylène alkyl éthers, un bloc co-polymères d'éthylène/polypropylène et polyéthylèneglycol. Avantageusement, les détergents préférés sont le polysorbate 80 et le polysorbate 20.

Avantageusement, la composition de facteur VII obtenue à l'issue de l'étape de mélange avec la solution tampon comprend :

- le facteur VII selon l'invention, de préférence sous forme activée ;
- de 10 à 40 g/1 d'arginine, éventuellement sous forme de chlorhydrate ;
- de 4,2 à 6,6 g/1 d'isoleucine ;
- de 0,6 à 1,8 g/1 de lysine ;
- de 0,6 à 1,8 g/1 de glycine ;
- de 1 à 2 g/1 de citrate trisodique dihydraté ou de 0 à 0,2 g/L de chlorure de calcium dihydraté; et le cas échéant de 0 à 0,5 g/1 de polysorbate 80.

Selon un exemple particulier, la composition de facteur obtenue à l'issue de l'étape de mélange avec la solution tampon comprend du facteur VII (de préférence sous forme de facteur VIIa) à 0,2 à 2g/l, du chlorhydrate d'arginine à 24 g/1, de l'isoleucine à 6g/l, du citrate trisodique dihydraté à 1,5 g/1, de la glycine à 1,2g/l, du chlorhydrate de lysine à l,2g/l. et /ou du polysorbate 80 à 0,07g/l.

Selon un exemple particulier, la composition de facteur obtenue à l'issue de l'étape de mélange avec la solution tampon comprend du facteur VII (de préférence sous forme de facteur VIIa) à 0,2 à 2g/l, du chlorhydrate d'arginine à 24 g/1, de l'isoleucine à 6g/l, - du citrate trisodique dihydraté à 1,5 g/1, de la glycine à 1,2g/l, du chlorhydrate de lysine à l,2g/l. et /ou du polysorbate 80 à 0,09g/l.

Selon un autre exemple particulier, la composition de facteur VII obtenue à l'issue de l'étape de mélange avec la solution tampon comprend facteur VII (de préférence sous forme de facteur VIIa) à 0,2 à 2g/l, du chlorhydrate d'arginine à 34 g/1, du chlorure de calcium dihydraté à 0,15 g/1, de l'isoleucine à 6g/l.

De préférence, la composition de facteur VII selon l'invention est dépourvue de tout sucre, de polyol ou de méthionine. Les sucres à éviter incluent notamment, en plus du saccharose, les di- et tri-saccharides et les polysaccharides, tels que le dextrose, le lactose, le maltose, le trehalose, les cyclodextrines, les maltodextrines et les dextrans. Les polyols à éviter incluent notamment, en plus du mannitol, le sorbitol et le xylitol.
De préférence encore, la composition est dépourvue de glycylglycine. De préférence encore, la composition est dépourvue de glycylglycine.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition de l'invention est en outre dépourvue de tout agent antioxydant. Les antioxydants incluent par exemple un ou plusieurs des composés suivants : homocystéine, cystéine, cystathionine, méthionine, gluthation.

Le pH de la solution avant dessiccation est de préférence compris entre 4,0 et 9,0, plus particulièrement dans les domaines 4,0 et 8,0 ; 4,0 et 7,5 ; 4,5 et 7,5 ; 5,0 et 7,5 ; 5,5 et 7,0 ; 6,0 et 7,5 ; 6,5 et 7,5.

La dessiccation est un procédé d'élimination de l'eau à un stade poussé. Il s'agit d'une déshydratation visant à éliminer autant d'eau que possible. Ce phénomène peut être naturel ou forcé. Cette dessiccation peut être réalisée à l'aide des techniques de lyophilisation, d'atomisation et de cryoatomisation. Le mode préféré d'obtention de la forme solide de la composition à usage pharmaceutique selon l'invention est la lyophilisation. Les méthodes de lyophilisation sont bien connues de l'homme du métier, voir par exemple [Wang et al, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, Vol 203, p 1-60, 2000].

D'autres procédés appropriés pour réduire le degré d'humidité ou la teneur en eau de la composition sont envisageables. De préférence le degré d'humidité est inférieur ou égal à 3% en poids, de préférence inférieur ou égal à 2,5%, de préférence inférieur ou égal à 2%, de préférence inférieur ou égal à 1,5%.

De manière préférée, le procédé de formulation comprend en outre une étape d'élimination ou d'inactivation des agents infectieux, par exemple par chauffage à sec du lyophilisât.

De manière préférée, le procédé de formulation comprend en outre une étape de filtration de la composition de facteur VII et/ou une étape de lyophilisation de la composition de facteur VII formulée.

La composition de facteur VII selon l'invention est particulièrement avantageuse lorsqu'elle est formulée selon le procédé décrit ci-dessus. En effet, le procédé de formulation selon l'invention appliqué à la composition de facteur VII selon l'invention permet d'améliorer sa stabilité.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de la composition de facteur VII de l'invention comme médicament, pour le traitement d'épisodes hémorragiques.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation de la composition de facteur VII selon l'invention pour la prévention des hémorragies survenant lors d'interventions chirurgicales ou de procédures invasives.

Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique comprenant la composition de facteur VII selon l'invention et un excipient et/ou un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'excipient peut être toute solution, telle qu'une solution saline, physiologique, isotonique ou tamponnée, ainsi que toute suspension, gel ou poudre, compatible avec un usage pharmaceutique et connu de l'homme du métier. Les compositions selon l'invention peuvent en outre contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, surfactants et conservateurs. D'autre part, les compositions selon l'invention peuvent comprendre d'autres agents ou principes actifs.

Par ailleurs, les compositions peuvent être administrées de différentes manières et sous différentes formes. L'administration peut être réalisée par toute voie classique pour ce type d'approche thérapeutique, comme notamment par voie systémique, en particulier par

injection intraveineuse, intradermique, intra-tumorale, sous-cutanée, intra-péritonéale, intramusculaire ou intra-artérielle. On peut citer par exemple l'injection intra-tumorale ou l'injection dans une zone proche de la tumeur ou irriguant la tumeur.

Les doses peuvent varier en fonction du nombre d'administrations, de l'association à d'autres principes actifs, du stade d'évolution de la pathologie, etc.

Bien entendu, la présente invention n'est pas limitée aux exemples et au mode de réalisation décrits et représentés, mais elle est susceptible de nombreuses variantes accessibles à l'homme de l'art.

EXEMPLES

Exemple 1 : Production de lapines transgéniques produisant une protéine de FVII humain dans leur lait.

On a préparé un vecteur d'expression composé d'une séquence insulatrice béta-globine de poulet, d'une région promotrice béta-caséine de chèvre, d'une séquence d'ADNc optimisée pour l'expression en cellules de mammifère codant pour le FVII humain et d'une région non traduite de la béta-caséine en 3', dans un squelette de SuperCos. L'assemblage en figure 6 représente le vecteur de construction.

Le transgène a été préparé à partir de la digestion du vecteur de construction avec l'endonucléase de restriction NotI pour libérer le squelette SuperCos et linéariser le vecteur d'expression. Les fragments résultants ont été séparés par électrophorèse sur gel, purifiés à partir du gel puis utilisés pour la micro-injection.

Pour produire des lapins transgéniques, la micro-injection du transgène dans des pronucléus mâles d'embryons fertilisés recueillis de lapins WT a été réalisée. Après une période de culture *in vitro* de quelques heures, les pronucléus mâles d'embryons micro-injectés ont été transférés dans l'oviducte de femelles non-transgéniques hormonalement préparées. Après gestation, des descendants sont obtenus. Une analyse génétique permet d'évaluer la présence du transgène du FVII humain par analyse PCR en utilisant des séquences d'amorces spécifiques du FVII humain.

La présence du transgène et son intégrité a été révélée par la technique de Southern Blot à partir de l'ADN extrait des lapereaux transgéniques obtenus.

Une analyse phénotypique permet d'évaluer la concentration de FVII humain exprimé dans le lait des lapines transgéniques. Cette mesure est réalisée par méthode immunoenzymatique (ELISA) avec des réactifs commmerciaux (Diagnostica Stago). Brièvement, le facteur VII à doser est capté par un anticorps anti-facteur VII humain immobilisé sur une phase solide. Le Facteur VII fixé est ensuite reconnu par un immuno-conjugué à la peroxydase. Le taux de peroxydase liée est mesuré par son activité sur le substrat ortho-phénylènediamine en présence d'eau oxygénée. L'intensité de la coloration, après arrêt de la réaction par un acide fort, est fonction de la quantité de facteur VII présente initialement dans l'échantillon.

Exemple 2 : Purification et extraction du facteur VII obtenu

Le procédé de purification et d'extraction du facteur VII mis en œuvre dans cet exemple est décrit ci-après.

Le lait de lapines transgéniques est obtenu à partir de la lignée de lapines transgéniques R69. Le lait de lapines transgéniques congelé est décongelé et concentré sous forme de pool de lait de lapines transgéniques.

Le pool de lait de lapines transgéniques ainsi obtenu est ensuite soumis à une étape de clarification utilisant un filtre en profondeur ayant une porosité de 0,2µm, afin d'éliminer les lipides et les composés insolubles. Le lait ainsi clarifié est ensuite soumis à une étape d'inactivation virale par traitement par un solvant de type détergent, par exemple Polysorbate 80 ou Tri-n-Butyl Phosphate à 25°C ± 2°C pendant au moins deux heures. Un tel traitement permet notamment d'inactiver efficacement les virus et en particulier, les virus de type virus non-enveloppés. Le lait clarifié et viralement inactivé est ensuite soumis à une étape de chromatographie d'affinité utilisant un ligand d'affinité spécifique du facteur VII/facteur VIIa. L'éluat de facteur VII obtenu à l'issue de cette étape de chromatographie est ensuite soumis à une étape d'ultrafiltration et de formulation, permettant ainsi d'obtenir un concentré de facteur VII intermédiaire ayant une pureté de 95%.

Le concentré de facteur VII intermédiaire est ensuite soumis à une étape de filtration utilisant un filtre ayant une porosité de 0,2µm à 0,2µm suivi d'une étape de nanofiltration sur des filtres ayant une porosité de 20nm puis 15nm. Le produit ainsi obtenu et contenant le facteur VII est ensuite soumis à une étape de chromatographie de type gel Q Sepharose XL puis à une étape de chromatographie de type CHT-I suivie d'une chromatographie de type SEC Superdex 200. Le concentré de facteur VII ainsi obtenu est ensuite soumis à une étape de stabilisation puis de filtration sur filtre ayant une porosité de 0,2µm.

Le procédé ainsi décrit permet d'obtenir un concentré de facteur VII ayant une pureté environ 99,9995%.

Le procédé de purification et d'extraction du facteur VII est décrit plus en détails dans la demande EP12305882.

Dans les exemples figurant dans la présente demande, on appelle « FVII-rec », le facteur VII activé recombinant disponible sur le marché (Novoseven®), produit par génie génétique à partir de cellules rénales BHK de hamsters nouveau-nés.

Exemple 3 : Etude du profilage de charge des N-glycannes

A/ L'identification et la quantification des oligosaccharides N-liés par chromatoraphie en phase liquide à haute performance à polarité de phase normale en mode HILIC couplée à une détection fluorimétrique (HILIC-HPLC/FD), dite méthode « HILIC »

La méthode de chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC ou Hydrophilic Interaction Chromatography) est une variante de la chromatographie en phase normal (NP) et permet de séparer efficacement les espèces polaires en évitant les désavantages liés à l'utilisation de solvants non miscibles dans l'eau. La phase stationnaire est un matériau polaire en général à base de silice ou de supports polymériques greffé par un groupement fonctionnel comme un groupe cyano, amino, diol, amide etc et la phase mobile est organique et contient de l'eau comme éluant fort.

Le facteur VII est tout d'abord soumis à une digestion enzymatique à la PNGase F afin de libérer spécifiquement les dérivés N-glycanniques.
Ceux-ci sont isolés par extraction sur phase solide (SPE) puis marqués à l'aide d'un fluorophore : le 2-aminobenzamide (2-AB) selon Bigge et al (Bigge, J.C., et al., Non-selective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-aminobenzamide and anthranilic acid, Anal. Biochem., 230, 229-238 (1995)). L'analyse des dérivés N-glycanniques est enfin réalisée par HILIC-HPLC/FD selon Guile et al (Guile, G.R., et al., A rapid and high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycans mixtures and analyzing oligosaccharide profiles, Anal. Biochem., 240, 210-226 (1996)). La détection est assurée par fluorescence aux longueurs d'ondes λ excitation 330 nm et λ émission 420 nm.

Les résultats obtenus pour le facteur VII de l'invention ainsi que pour le FVII-rec sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 1 : Quantification des formes N-glycanniques neutres, monochargées et bichargées du facteur VII de l'invention obtenue par la méthode HILIC

	FVII (lot1)	FVII (lot2)	FVII (lot3)
Formes N-glycanniques (exprimées en %)			
Neutres	3,6	4,3	3,9
Monochargées	75,5	74,6	75,3
Bichargées	21,0	21,2	20,6

Les résultats obtenus par la méthode HILIC montrent que le facteur VII de l'invention possède un taux de formes N-glycanniques neutres comprises entre 3,6% et 4,3 %, de formes N-glycanniques monochargées comprises entre 74.6% et 75.5 % et de formes N-glycanniques bichargées comprises entre 20,6% et 21,2%.

Tableau 2 : Quantification des formes N-glycanniques neutres, monochargées et bichargées, trichargées, tétrachargées du facteur VII-rec obtenue par la méthode HILIC

Formes N-glycanniques (exprimées en %)	FVII-rec	FVII-rec (résultats issus de la publication de Klausen et al*)
Neutres	11,3	9,4
Monochargées	25,1	27,9
Bichargées	55,1	51,2
Trichargées	7,3	11,6
Tétrachargées	0,7	0

(*Klausen et al., Analysis of the site-specific asparagine-linked glycosylation of recombinant human coagulation factor VIIa by glycosidase digestions, liquid chromatography, and mass spectrometry, Mol Biotechnol. 1998 June;9(3):195-204.).

Les résultats obtenus par la méthode HILIC montrent que les formes N-glycanniques neutres du FVII-rec représentent 11,3 % des formes N-glycanniques du FVII-rec, que les

formes N-glycanniques monochargées représentent 25.1% des formes N-glycanniques du FVII-rec, et que les formes N-glycanniques bichargées représentent 55,1% des formes N-glycanniques du FVII-rec. De plus le facteur VII-rec possède une quantité non négligeable de formes trichargées et tétrachargées.

Les résultats ainsi obtenus par la méthode HILIC sont donc conformes à ceux présentés dans la publication de Klausen et al.

B/ Identification et quantification des oligosaccharides N-liés par la méthode AEX/UPLC/FD

La séparation des N-glycannes en fonction de leur charge est effectuée par profilage AEX-UPLC/FD des N-glycannes dérivés à la 2-AB. Le mode opératoire de préparation des N-glycannes dérivés à la 2-AB est identique à celui décrit précédemment pour l'analyse des N-glycannes par HILIC-HPLC/FD.

Le profilage de charge des N-glycannes de FVII par AEX-UPLC/FD a été réalisé à l'aide d'une colonne d'échange d'anions faible de type aminopropyl. Les glycannes sont séparés en fonction de leur charge en appliquant un gradient croissant de formiate d'ammonium. La détection des dérivés est effectuée aux longueurs d'ondes suivantes : longueur d'ondes d'excitation : 330 nm et longueur d'ondes d'émission : 420 nm. Le profil obtenu par AEX-UPLC/FD pour le FVII (lot 1) est présenté en Figure 3.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Quantification des formes N-glycanniques neutres, monochargées et bichargées obtenues pour le facteur VII de l'invention par la méthode AEX-UPLC/FD

		FVII (lot1)	FVII (lot2)	FVII (lot3)
Formes N-glycanniques s	Temps de rétention	exprimé en %	exprimé en %	exprimé en %
Neutres	2-6 min	4,0	4,2	3,4
Monochargées	11-14 min	76,5	76,9	77,2
Bichargées	17-20 min	19,6	18,9	19,4

On observe que le pourcentage des formes N-glycanniques monochargées des trois lots de FVII selon l'invention est compris entre 76 et 78%.

Ces deux méthodes orthogonales (HILIC et AEX) montrent qu'au moins 74,6% des formes N-glycanniques de facteur VII de l'invention sont monochargées, indépendamment de la méthode de mesure utilisée.

C/ Identification, Quantification et Comparaison des oligosaccharides N-liés par la méthode AEX/UPLC/FD pour le facteur VII de l'invention, le facteur VII issu de la demande WO2007/138199 et du Facteur VII-rec.

Le mode opératoire utilisé est le même que celui décrit à l'Exemple 3. Le profilage de charge des N-glycannes de FVII par AEX-UPLC/FD a été réalisé sur le facteur VII de l'invention, le facteur VII issu de la demande WO2007/138199 et du Facteur VII-rec. Les profils glycanniques sont présentés en Figure 5. La Figure 5 A présente le profil glycannique du FVII issu de la demande WO2007/138199, la Figure 5B présente le profil glycannique du FVII de l'invention et la Figure 5C présente le profil glycannique du FVII-rec.

Tableau 4 : Quantification des formes N-glycanniques neutres, monochargées et bichargées obtenues par la méthode AEX-UPLC/FD

		FVII de l'invention (Lot 4)	FVII (issu de la demande WO2007/138199)	Facteur VII-rec
Formes N-glycanniques s	Temps de rétention	exprimé en %	exprimé en %	exprimé en %
Neutres (Z_0)	3-5 min	7,0	3,0	7,0
Monochargées (Z_1)	5-7 min	73,0	51,0	29,0
Bichargées (Z_2)	7-10 min	20	39,0	54,0
Trichargées (Z_3)	10-12 min	0,0	7,0	9,0
Tétrachargées (Z_4)	12-14 min	0,0	0,0	1,0

En ce qui concerne le FVII issu de la demande WO2007/138199, les résultats obtenus par la méthode AEX/UPLC/FD montrent :

- que les formes N-glycanniques neutres du FVII issu de la demande WO2007/138199 représentent 3 % des formes N-glycanniques de ce FVII,
- que les formes N-glycanniques monochargées représentent 51% des formes N-glycanniques de ce FVII, et
- que les formes N-glycanniques bichargées représentent 39% des formes N-glycanniques de ce FVII.
- Une quantité non négligeable de formes trichargées.

Les résultats obtenus par la méthode AEX/UPLC/FD montrent que les formes N-glycanniques neutres du FVII-rec représentent 7,0 % des formes N-glycanniques du FVII-rec, que les formes N-glycanniques monochargées représentent 29,0 % des formes N-glycanniques du FVII-rec, et que les formes N-glycanniques bichargées représentent 54,0 % des formes N-glycanniques du FVII-rec. De plus le facteur VII-rec possède une quantité non négligeable de formes trichargées et tétrachargées.

Exemple 4 : Identification, Quantification et Comparaison des formes N-glycanniques du facteur VII selon l'invention et du facteur VII issu de la demande WO2007/138199 par la méthode HILIC

A/ Quantification des formes N-glycanniques du facteur VII selon l'invention réalisée à l'aide de la méthode HILIC

La quantification des formes N-glycanniques du facteur VII selon l'invention est réalisée à l'aide de la méthode HILIC, comme décrite dans l'exemple 3.
Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Quantification des N-glycannes obtenues pour la composition de facteur VII de l'invention

Formes N-glycanniques (exprimées en %)	FVII (lot 1)	FVII (lot 2)	FVII (lot 3)	Charge
A1G0	0,5	0,8	0,5	0

Man5	1,3	1,5	1,4	0
Man4-A1G1	0,2	0,4	0,4	0
A2G2	1,4	1,1	1,2	0
A1G1S1	1,1	1,2	1,2	1
A2G2F	0,5	0,4	0,4	0
A2G1S1	0,5	0,7	0,3	1
Man4-A1G1S1	2,8	2,9	4,2	1
Man6PGlcNAc	9,8	9,1	9,9	1
A2G2S1	43,3	41,8	41,1	1
A2G2S1-SO3H	0,9	0,9	0,9	2
Man5-A1G1S1	0,2	0,4	0,2	1
A2G2FS1	8,8	9,3	9,9	1
Man7PGlcNAc	2,8	3,2	3	1
A2G2FS1*	2	2,3	1,9	1
Man7PGlcNAc*	1,7	1,6	1,6	1
A2G2F2S1	2,2	2,2	2	1
A2G2S2	9,1	9,7	8,8	2
Man7(PGlcNAc)2	3,4	2,8	3,2	2
A2G2FS2	2,6	3,1	2,8	2
Man6PGlcNAc-A1G1S1	5	4,7	4,9	2
High-Mannose/Hybride neutre	1,5	1,9	1,8	0
High-Mannose/Hybride monochargé	17,3	17,2	18,9	1
High-Mannose/Hybride bichargé	8,4	7,5	8,1	2
Total High-Mannose/Hybride	27,2	26,6	28,8	-
Formes N-glycanniques monochargées	75,2	74,7	75,3	1
Complexe monosialylé	58,8	58,4	57,3	1
Complexe bisialylé	11,7	12,8	11,6	2

* Formes isomériques

L'analyse quantitative des différentes structures glycanniques (Tableau 5) montre que les formes N-glycanniques des facteurs VII de la composition sont majoritairement complexes

monosialylées (à hauteur de 60% environ). Les formes N-glycanniques de type High Mannose/ Hybride sont présentes à au moins 25%.

B/ Quantification des formes N-glycanniques du facteur VII issu de la demande WO2007/138199 réalisée à l'aide de la méthode HILIC

La quantification des formes N-glycanniques du facteur VII issu de la demande WO2007/138199 est réalisée à l'aide de la méthode HILIC, comme décrite dans l'exemple 3. Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6: Quantification des N-glycannes obtenues pour la composition de facteur VII issu de la demande WO2007/138199

Formes N-glycanniques (exprimées en %)	FVII issu de la demande de brevet WO2007/138199	Charge
Man5	0,7	0
A2G2	0,3	0
A1G1S1	0,6	1
Man5-A1G1	0,3	0
A2G2F	0,3	0
A2G1S1+A1G1FS1	0,4	1
Man4-A1G1S1	0,8	1
Man6PGlcNAc	6,2	1
Man6PGlcNAc*	1,4	1
A2G2S1	18,2	1
A2G2FS1	9	1
Man7PGlcNAc	1,6	1
A2G2FS1*	4	1
Man7PGlcNAc*	0,6	1
Monocharged HM/Hyb	0,3	1
A2G2F2S1	9,7	1
A2G2S2	10,9	2
A3G3S1	0,7	1
Man7(PGlcNAc)2	2	2
A2G2FS2	15,9	2
A3G3F0-1S1	0,3	1
A3G3F0-1S1*	0,9	1
A3G3F1-2S1	0,6	1
Man6PGlcNAc-A1S1	4,3	2
A3G3S2	1,8	2

A3G3S2*	0,5	2
A3G3FS2	1	2
A3G3FS2*	1,1	2
A3G3F0-2S2	0,7	2
A3G3F0-2S2-3	0,7	3
A3G3S3	2,8	3
A3G3F0-2S3	1	3
A3G3F0-2S3*	0,3	3
High-Mannose/Hybride neutre	1	0
High-Mannose/Hybride monochargé	10,9	1
High-Mannose/Hybride bichargé	6,3	2
Total High-Mannose/Hybride	18,2	-
Formes N-glycanniques monochargées	55,3	1
Complexe monosialylé	44,4	1
Complexe bisialylé	31,9	2
Neutre (Z0)	2	0
Monochargé (Z1)	55	1
Bichargé (Z2)	38	2
Trichargé (Z3)	5	3

* Formes isomériques

L'analyse quantitative des différentes structures glycanniques (Tableau 6) montre que les formes N-glycanniques des facteurs VII issu de la demande WO2007/138199 sont majoritairement de type complexes monosialylées (à hauteur de 45% environ). Les formes N-glycanniques de type High Mannose/hybride sont présentes à environ 18%.

Exemple 5 : Quantification des γ-carboxylations

Le facteur VIIa humain présente d'autres modifications post-traductionnelles, telles que la γ-carboxylation du domaine GLA N-terminal. Pour le facteur VII plasmatique, les dix premiers acides glutamiques sont tous γ-carboxylés (Jurlander B. et al., Recombinant activated factor VII (rFVIIa): characterization, manufacturing, and clinical development. Semin. Thromb. Hemost. 27.4 (2001): 373-84., alors que la dixième acide glutamique du NovoSeven® est seulement partiellement γ-carboxylé (Thim L. et al., Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells. Biochemistry. 27.20 (1988): 7785-93.

L'étude des γ-carboxylations du facteur VII de l'invention a été réalisée en utilisant la méthode de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse décrite ci-dessous (LC-MS).

Le facteur VII est préalablement réduit et alkylé puis soumis à une digestion enzymatique au moyen d'une enzyme spécifique de type trypsine. Les peptides ainsi générés sont analysés par spectrométrie de masse électrospray après séparation par chromatographie liquide en phase inverse de type C18 (Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A., (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. Annu Rev Biomed Eng. 11, 49-79.). Cette approche permet de mesurer la masse précise du peptide N-terminal γ-carboxylé du facteur VII et d'en déduire son niveau de γ-carboxylation.

La figure 2 montre le spectre de masse du peptide N-terminal [Ala_1-Arg_{36}]. La masse moyenne mesurée est de 4768,0 Da, ce qui est en accord avec la masse théorique de 4768,0 Da (cystéines réduites et alkylées), ce qui correspond à 9 γ-carboxylations. Le facteur VII de la présente invention présente donc 9 γ-carboxylations. La figure 2 contient également le spectre de masse du peptide N-terminal [Ala_1-Lys_{32}], qui est élué dans un temps de rétention proche. La masse moléculaire du peptide est également en accord avec la présence de 9 γ-carboxylations sur le peptide. Il peut donc être conclu que le facteur VII de l'invention possède 9 résidus glutamiques γ-carboxylés sur les dix sites potentiels, et que le résidu glutamique situé en position 35 par rapport à la séquence du facteur VII humain (Glu_{35}) n'est pas γ-carboxylé.

Par ailleurs, le peptide [Asp_{33}-Gly_{47}] a été isolé par cartographie peptidique. Ce peptide contient l'acide aminé Glu_{35} qui a été trouvé majoritairement sous sa forme non-carboxylée à une masse de 1786,9 Da. Une forme minoritaire de ce peptide a été découverte à une masse de 1830,9 Da, correspondant à un Glu_{35} modifié. Cette forme est estimée à moins de 5%, basée sur les signaux MS. Ce résultat confirme la présence de γ-carboxylations sur les neuf premiers acides glutamiques du facteur VII de l'invention alors que le dixième n'est majoritairement pas γ-carboxylé.

La répartition des différents isoformes du facteur VII de l'invention a également été étudiée par chromatographie échangeuse d'ion dont le protocole est décrit ci-dessous. La même étude a été réalisée sur le FVII-rec.

Brièvement, les isoformes du facteur VII sont séparées sur colonne échangeuse d'anions fort (SAX). Un échantillon de facteur VII est d'abord chargé sur une colonne (Mono Q 5/50 GL, GE Healthcare) préalablement équilibrée à pH 9 avec un tampon Tris 20 mM. L'échantillon est ensuite élué en appliquant un gradient croissant de tampon d'élution de type Tris 20mM/NaCl 1M à pH 9.

Tableau 7 : Quantification des isoformes du facteur VII de l'invention et du FVII-rec - Intégration des pics observés sur les chromatogrammes « IEX ».

Facteur VII de l'invention

No.	**Temps de rétention (min)**	**Nom du pic**	**Quantification des isoformes du FVII (en %)**
1	26,43	FVII 9GLA	95
2	28,04	FVII 10GLA	5
Total			100

FVII-rec

No.	**Temps de rétention (min)**	**Nom du pic**	**Quantification des isoformes du FVII (en %)**
1	26,58	FVII-rec 9GLA	76
2	28,23	FVII-rec 10GLA	24
Total			100

Légende : « FVII 9GLA » signifie facteur VII dont les isoformes majoritaires présentent une γ-carboxylations sur 9 résidus d'acide glutamique, « FVII 10GLA » signifie facteur VII dont les isoformes majoritaires présentent une γ-carboxylations sur 10 résidus d'acide glutamique.

Il résulte des résultats présentés dans le tableau 5, que les isoformes majoritaires du facteur VII de l'invention sont les formes présentant 9 γ-carboxylations (95%). Parmi les isoformes du FVII-rec, 76 % des isoformes présentent 9 γ-carboxylations et 24 % des isoformes présentent 10 γ-carboxylations.

Exemple 6 : Etude du point isoélectrique

La séparation des différentes isoformes du facteur VII selon leur point isoélectrique a été réalisée par focalisation isoélectrique « IEF ». La migration électrophorétique s'est effectuée sur gel Focusgel 3-10 (Serva).

La qualité des lots de facteur VII est évaluée par analyse des différentes isoformes du produit après migration sur gel de gradient de pH 3-10 en conditions natives (non réductrices et non dénaturantes), selon la procédure générale d'analyse par IEF sur système Multiphor (GE Healthcare).

L'analyse IEF s'effectue sur Focusgel 3-10 sans puits SERVA. La concentration est estimé par prise de DO 280 nm (ε = 1.36 g-1. L.cm-1) après dessalage du produit sur membrane d'ultracentrifugation (seuil de coupure : 10 kDa).

La migration a lieu selon les paramètres électriques suivants (mode gradient) :

Etape	Voltage (V)	Ampérage (mA)	Puissance (W)	Temps (min)
1	375	35	20	29
2	500	30	20	1
3	750	30	25	99
4	2000	20	35	1
5	2000	20	35	20

Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie CCB-G250.

La détermination du pI des isoformes se fait après numérisation du gel et analyse par le logiciel Quantity One (Bio-Rad).

Les profils « IEF » du lot de facteur VII de l'invention et du FVII-rec sont présentés en Figure 4.

La détermination du pI des bandes est faite avec un standard dont les pI sont compris entre 5,20 et 8,15. Le point isoélectrique du facteur VII de l'invention est compris entre 6,1 et 7,3. Le profil des isoformes du facteur VII de l'invention inclut deux bandes majeures comprises entre 6,6 et 7,0 ainsi qu'une trace plus acide à pI 6,1 et une trace plus basique à pI 7,3. Les deux isoformes principals représentent environ 60% de la totalité des facteurs VII de la composition.
Le point isoélectrique du facteur VII-rec est compris entre 5,5 et 7,5. Le profil des isoformes du facteur VII-rec de l'invention inclut deux bandes majeures comprises entre 6,4 et 6,8 ainsi des traces plus acide comprises entre 5,5 et 6,4 et des traces plus basique entre 6,8 et 7,5. Les deux isoformes principales représentent environ 45% des facteurs VII de la composition du FVII-rec.
Il en résulte donc que point isoélectrique du facteur VII de l'invention est substantiellement plus homogène que celui observé pour le FVII-rec.

Exemple 7 : Activité du facteur VII de l'invention

Le dosage du FVII s'effectue par une méthode amidolytique (FVII:am) qui mesure son activité biologique, c'est-à-dire la capacité du complexe facteur VIIa / facteur tissulaire à activer le facteur X en présence d'ions calcium et de phospholipides.
Cette méthode est un dosage chromogènique en cinétique en deux étapes: l'activation du FX, sous l'action du FVIIa, dans un mélange réactionnel contenant de la thromboplastine et du calcium; puis le clivage enzymatique d'un substrat chromogène spécifique par le FXa qui libère un chromophore quantifiable par spectrophotométrie.
La lecture en cinétique est effectuée à 405nm contre 1 filtre de référence à 490 nm.

Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Dosage de l'activité spécifique du facteur VII de l'invention

Echantillons	Activité amidolytique (UI/ml)	FVII-Ag : Taux de protéines (mg/ml)
FVII de l'invention (lot 1)	3307	0.9
FVII de l'invention (lot 2)	3377	1.1
FVII de l'invention (lot 3)	3067	1.0

L'activité amidolytique du facteur VII de l'invention est comprise entre 3067 UI/ml et 3377 UI/ml.

REVENDICATIONS

1. Composition de facteur VII dans laquelle les molécules de facteur VII présentent un point isoélectrique substantiellement homogène.

2. Composition de facteur VII dans laquelle parmi toutes les formes N-glycanniques du facteur VII de la composition, au moins 60 % desdites formes N-glycanniques sont monochargées, et au moins 80% desdites molécules présentent une γ-carboxylation sur 9 résidus d'acide glutamique.

3. Composition selon la revendication 2 dans laquelle, au moins 65%, de préférence au moins 70%, de préférence au moins 80% des formes N-glycanniques du facteur VII de la composition sont monochargées.

4. Composition selon l'une des revendications 2 à 3, dans laquelle parmi toutes les molécules de facteur VII de la composition, au moins 85%, de préférence de 85% à 100%, de préférence de 90% à 100%, de préférence de 95% à 100% desdites molécules présentent une γ-carboxylation sur 9 résidus d'acide glutamique.

5. Composition selon la revendication 4, dans laquelle le taux de γ-carboxylation présent sur le résidu d'acide glutamique 35 (Glu35) est inférieur à 20%, de préférence inférieur à 15%, de préférence inférieur à 10%.

6. Composition de facteur VII selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle au moins 60% des formes N-glycanniques des facteurs VII de la composition sont complexes monosialylées.

7. Composition de facteur VII selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle au moins 10%, de préférence au moins 15%, de préférence au moins 20%, de préférence au moins 25% des formes N-glycanniques des facteurs VII de la composition sont high Mannose/ hybride.

8. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle au moins 90%, de préférence au moins 95% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieur à 1,2.

9. Composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle au moins 50%, de préférence au moins 55%, de préférence 60% des molécules de facteur VII de la composition ont un point isoélectrique compris dans un écart d'unité de pH inférieur à 1 ; de préférence inférieur à 0,5, de préférence inférieur à 0,4.

10. Composition selon l'une des revendications 1 à 9, dans laquelle le facteur VII est recombinant ou transgénique.

11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle le facteur VII de la composition est produit par des lapines transgéniques.

12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, dans laquelle le facteur VII est un facteur VII activé.

13. Composition de facteur VII selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour une utilisation dans le traitement des épisodes hémorragiques.

14. Composition de facteur VII selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour une utilisation dans la prévention des hémorragies survenant lors d'interventions chirurgicales ou de procédures invasives.

15. Composition de facteur VII selon l'une des revendications 1 à 14 susceptible d'être obtenue par un procédé comprenant les étapes suivantes :

(a) l'insertion d'une séquence d'ADN comprenant un gène codant pour le facteur VII dans un embryon de mammifère non-humain, ledit gène étant sous le contrôle transcriptionnel du promoteur béta-caséine,

(b) le transfert d'embryons obtenus à l'étape a) dans l'oviducte d'une femelle de mammifère non-humain de manière à ce qu'il se développe en un mammifère adulte,

(c) l'induction de la lactation chez le mammifère adulte non-humain obtenu à l'étape b) de type femelle ou dans un descendant femelle de ce mammifère non-humain dans lequel le gène et le promoteur sont présents dans son génome,

(d) la collection du lait dudit mammifère non-humain, et

(e) la purification du facteur VII présent dans le lait collecté.

16. Procédé de formulation d'une composition de facteur VII activé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, ledit procédé comprenant le mélange de la composition de facteur VII activé avec une solution tampon, l'ajustement du pH si nécessaire, la filtration puis la dessication si nécessaire pour obtenir la forme solide.

17. Procédé de formulation selon la revendication 16, dans lequel l'étape de mélange de la composition de facteur VII activé avec une solution tampon est mise en œuvre sur une chromatographie de type gel filtration.

18. Procédé de formulation selon l'une des revendications 16 à 17, dans lequel la solution tampon comprend un ou plusieurs des constituants choisis parmi :

- un sel, de préférence un sel de citrate, de préférence du citrate trisodique ;

- un acide aminé ou un sel d'acide aminé hydrophile, de préférence un sel d'acide aminé hydrophile, de préférence le chlorhydrate d'arginine et/ou chlorhydrate de lysine ;

- un acide aminé ou un sel d'acide aminé hydrophobe, de préférence un acide aminé hydrophobe, de préférence l'isoleucine et/ou la glycine.

19. Procédé de formulation selon l'une des revendications 16 à 18, ledit procédé comprenant en outre une étape de filtration de la composition de facteur VII formulée.

20. Procédé de formulation selon l'une des revendications 16 à 18, ledit procédé comprenant en outre une étape de lyophilisation de la composition de facteur VII formulée.

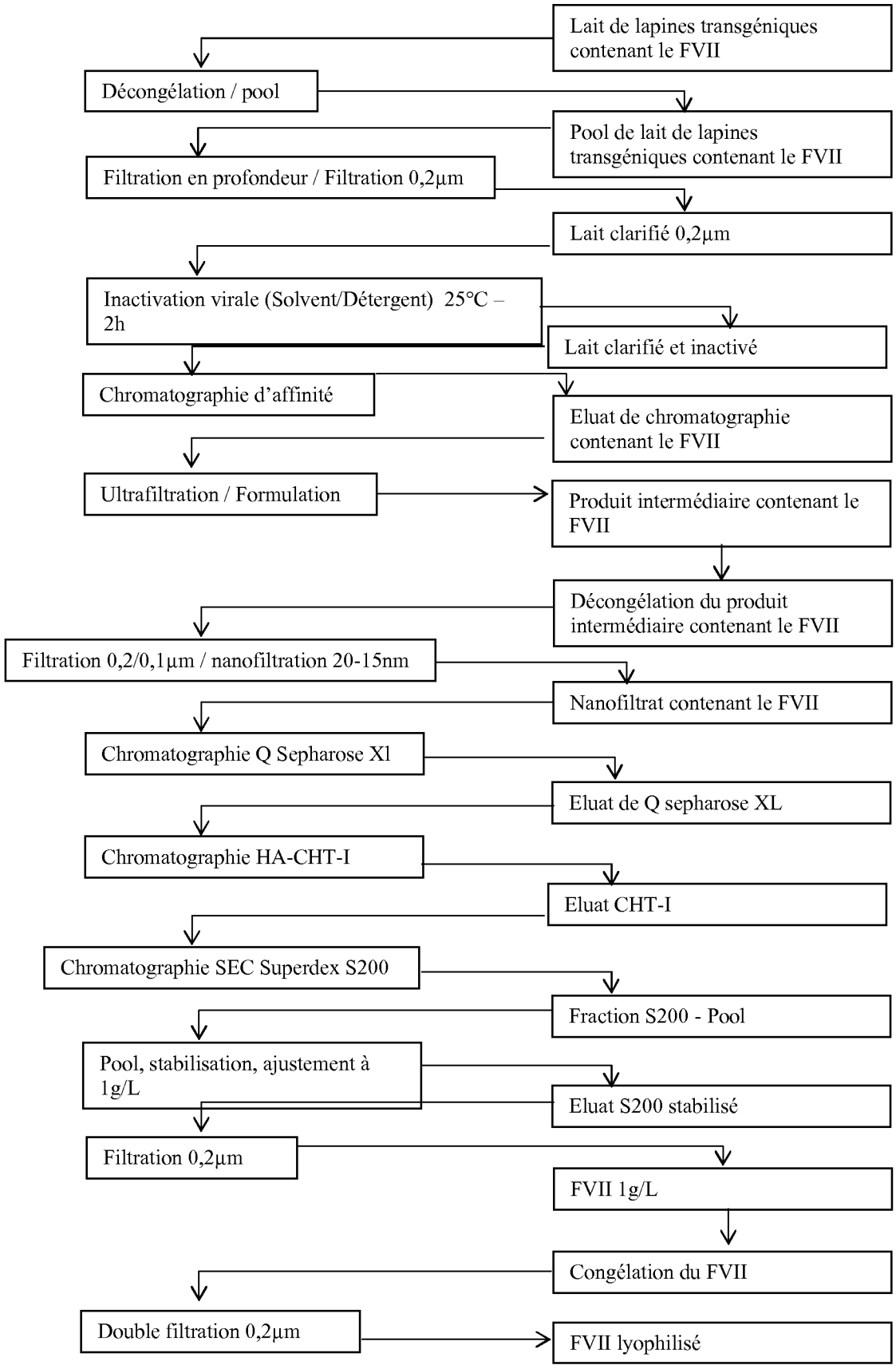

Lait de lapines transgéniques contenant le FVII
Décongélation / pool
Pool de lait de lapines transgéniques contenant le FVII
Filtration en profondeur / Filtration 0,2µm
Lait clarifié 0,2µm
Inactivation virale (Solvent/Détergent) 25°C – 2h
Lait clarifié et inactivé
Chromatographie d'affinité
Eluat de chromatographie contenant le FVII
Ultrafiltration / Formulation
Produit intermédiaire contenant le FVII
Décongélation du produit intermédiaire contenant le FVII
Filtration 0,2/0,1µm / nanofiltration 20-15nm
Nanofiltrat contenant le FVII
Chromatographie Q Sepharose Xl
Eluat de Q sepharose XL
Chromatographie HA-CHT-I
Eluat CHT-I
Chromatographie SEC Superdex S200
Fraction S200 - Pool
Pool, stabilisation, ajustement à 1g/L
Eluat S200 stabilisé
Filtration 0,2µm
FVII 1g/L
Congélation du FVII
Double filtration 0,2µm
FVII lyophilisé

Figure 1

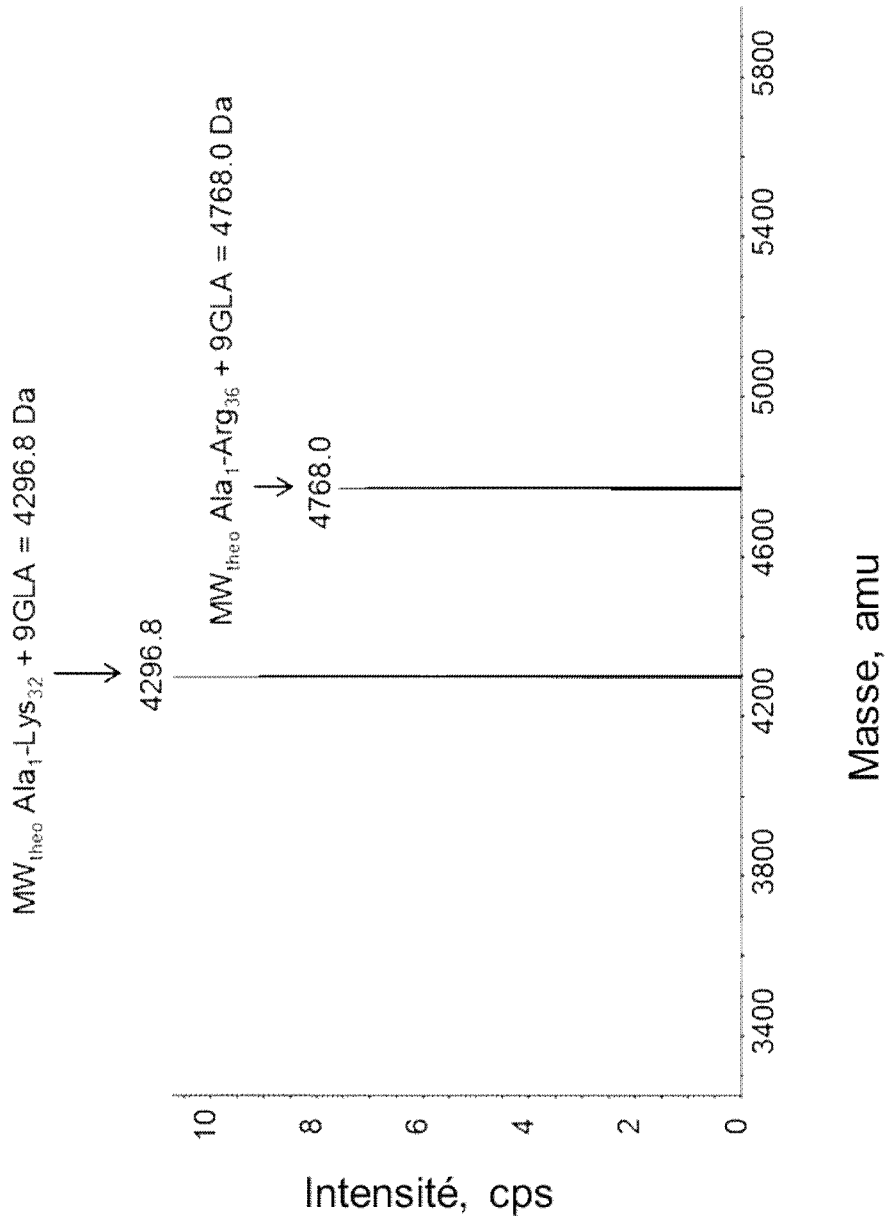

MW$_{theo}$ Ala$_1$-Lys$_{32}$ + 9GLA = 4296.8 Da
4296.8
MW$_{theo}$ Ala$_1$-Arg$_{36}$ + 9GLA = 4768.0 Da
4768.0
10
8
6
4
2
0
Intensité, cps
3400
3800
4200
4600
5000
5400
5800
Masse, amu

Figure 2

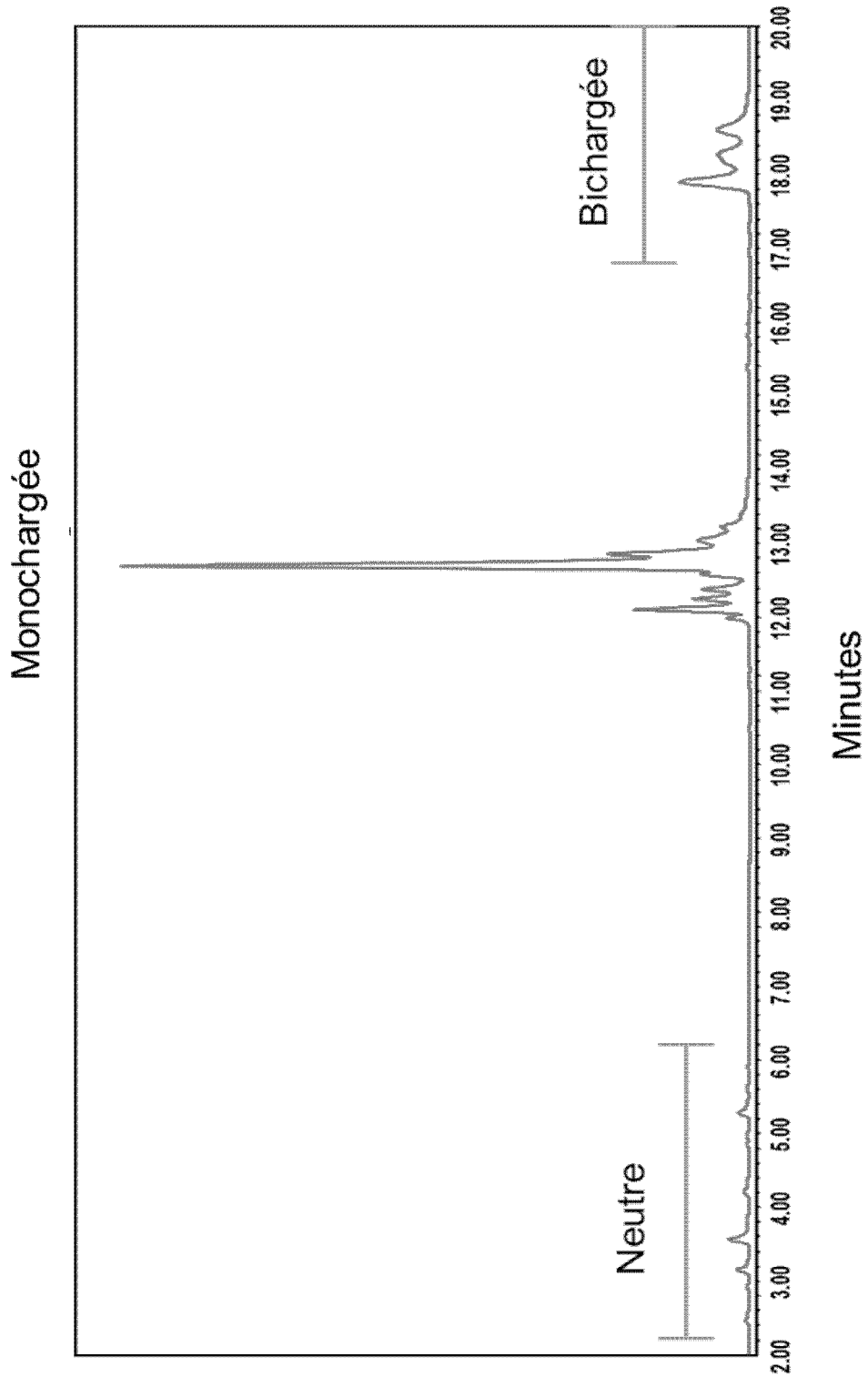

Monochargée
Bichargée
Neutre
Minutes
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00

Figure 3

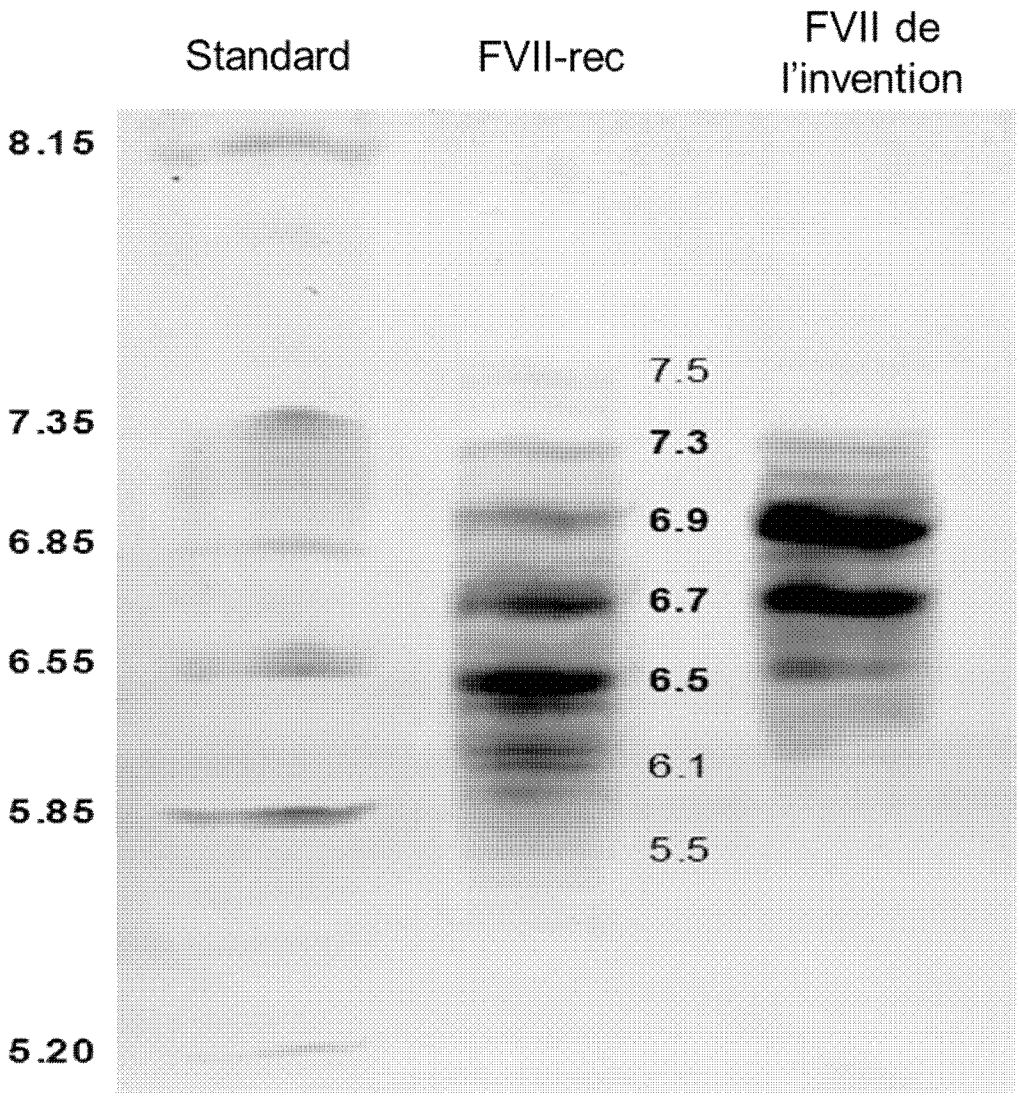

Standard
FVII-rec
FVII de l'invention
8.15
7.35
6.85
6.55
5.85
5.20
7.5
7.3
6.9
6.7
6.5
6.1
5.5

Figure 4

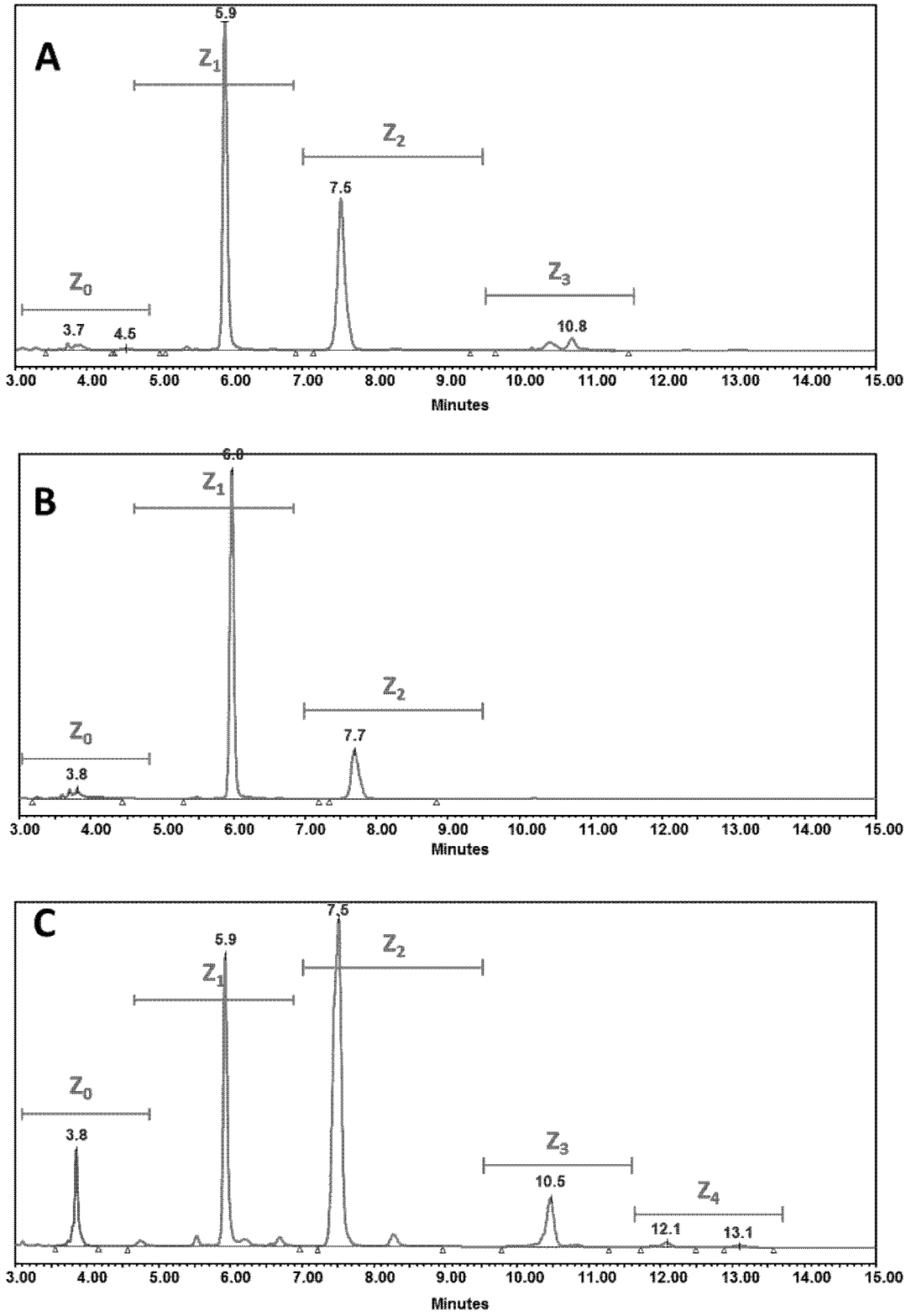

A
5.9
Z1
Z2
7.5
Z0
Z3
3.7
4.5
10.8
3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 12.00 13.00 14.00 15.00
Minutes
B
6.0
Z1
Z2
Z0
7.7
3.8
3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 12.00 13.00 14.00 15.00
Minutes
C
7.5
5.9
Z2
Z1
Z0
3.8
Z3
10.5
Z4
12.1
13.1
3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 12.00 13.00 14.00 15.00
Minutes

Figure 5

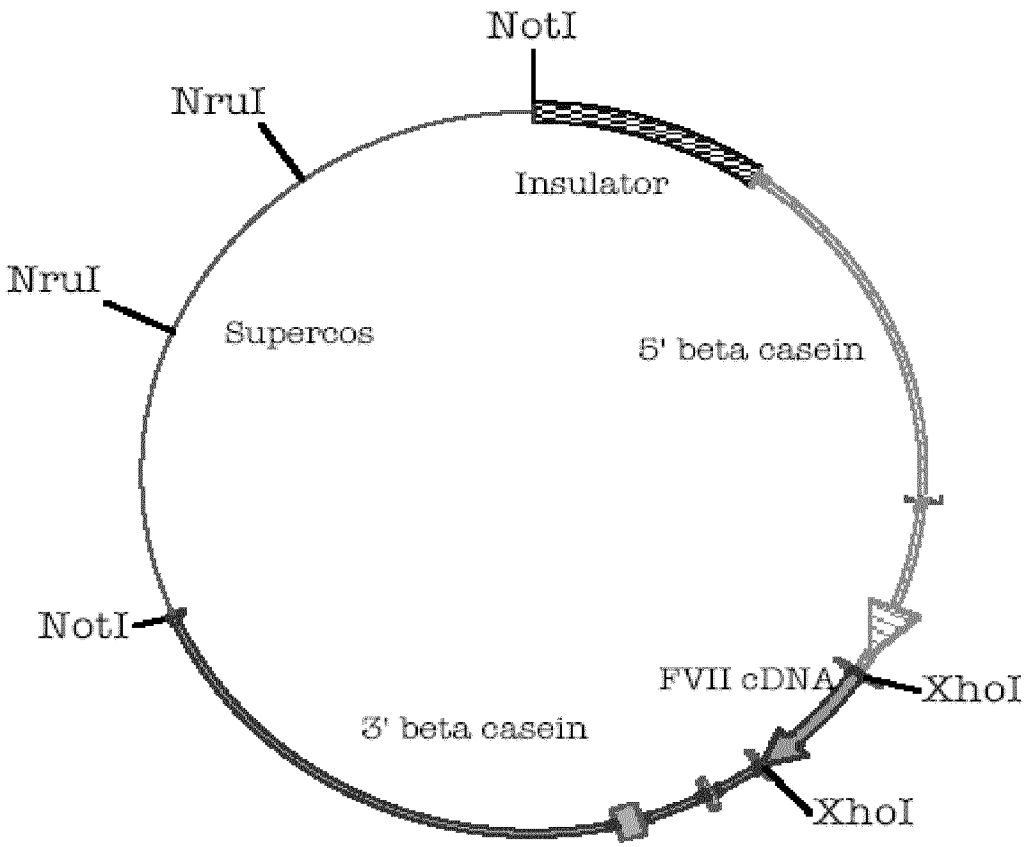

NotI
NruI
Insulator
NruI
Supercos
5' beta casein
NotI
FVII cDNA
XhoI
3' beta casein
XhoI

Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/062051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/36 A01K67/027 C07K14/745 C12N9/64 A61P7/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A01K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	G. CHEVREUX ET AL: "N-/O-glycosylation analysis of human FVIIa produced in the milk of transgenic rabbits", GLYCOBIOLOGY, vol. 23, no. 12, 2 October 2013 (2013-10-02), pages 1531-1546, XP055090715, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/glycob/cwt085 the whole document	1-15
A	EP 0 527 063 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 10 February 1993 (1993-02-10) cited in the application the whole document	1-12

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 July 2014	01/08/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hars, Jesko

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 901 707 A1 (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 7 December 2007 (2007-12-07) cited in the application the whole document	1,10-20
X	WO 2008/099077 A2 (LFB BIOTECHNOLOGIES [FR]; NOGRE MICHEL [FR]; LEJARS ALAIN [FR]; OLLIVI) 21 August 2008 (2008-08-21) the whole document	1,10-14, 16-20
X,P	EP 2 687 595 A1 (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 22 January 2014 (2014-01-22) cited in the application the whole document	1-20
Y	US 2006/179500 A1 (MEADE HARRY M [US] ET AL) 10 August 2006 (2006-08-10) paragraphs [0068], [0076], [0099], [0100]; figure 1	15
Y	MAKSIMENKO O G ET AL: "Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems.", ACTA NATURAE JAN 2013, vol. 5, no. 1, January 2013 (2013-01), pages 33-46, XP05513122, ISSN: 2075-8251 the whole document	15
Y	YANN ECHELARD ET AL: "Transgenic Technology: a Validated Approach for Large-Scale Manufacturing", IPT ONLINE, vol. 29, 11 June 2009 (2009-06-11), pages 50-54, XP055131254, the whole document	15
X	Anonymous: "GTC BIOTHERAPEUTICS REPORTS THIRD QUARTER 2007 FINANCIAL RESULTS for rEVO Biologics, Inc. (GTCB)", , 1 January 2007 (2007-01-01), pages 1-16, XP055131257, Retrieved from the Internet: URL:http://www.wikinvest.com/stock/GTC_Biotherapeutics_(GTCB)/Gtc_Biotherapeutics_Reports_2007_Financial_Results [retrieved on 2014-07-23] page 14	15
X	WO 2010/149907 A1 (LFB BIOTECHNOLOGIES [FR]; BARDAT ANNIE [FR]; POMPE CORNELIUS [FR]) 29 December 2010 (2010-12-29) page 14, paragraph 1	1,10-14, 16-20

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2014/062051

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0527063 A1	10-02-1993	AT 248221 T	15-09-2003
		CA 2111238 A1	23-12-1992
		DE 69233173 D1	02-10-2003
		DE 69233173 T2	27-05-2004
		DK 0527063 T3	22-12-2003
		EP 0527063 A1	10-02-1993
		ES 2206444 T3	16-05-2004
		FR 2677652 A1	18-12-1992
		JP 3824632 B2	20-09-2006
		JP H06508515 A	29-09-1994
		PT 527063 E	30-01-2004
		WO 9222644 A1	23-12-1992
FR 2901707 A1	07-12-2007	AR 061430 A1	27-08-2008
		AU 2007266952 A1	06-12-2007
		BR PI0710706 A2	16-08-2011
		CA 2652496 A1	06-12-2007
		CA 2820391 A1	06-12-2007
		CN 101460189 A	17-06-2009
		CN 103408655 A	27-11-2013
		EP 2037955 A2	25-03-2009
		FR 2901707 A1	07-12-2007
		JP 2009538885 A	12-11-2009
		JP 2013177440 A	09-09-2013
		KR 20090031676 A	27-03-2009
		TW 200817032 A	16-04-2008
		US 2009311239 A1	17-12-2009
		US 2014093491 A1	03-04-2014
		WO 2007138199 A2	06-12-2007
WO 2008099077 A2	21-08-2008	AR 064683 A1	22-04-2009
		AU 2008214544 A1	21-08-2008
		BR PI0805838 A2	30-08-2011
		CA 2673583 A1	21-08-2008
		CN 101600358 A	09-12-2009
		CN 103910778 A	09-07-2014
		EP 2134191 A2	23-12-2009
		FR 2910786 A1	04-07-2008
		IL 199360 A	30-05-2013
		JP 5196590 B2	15-05-2013
		JP 2010514746 A	06-05-2010
		KR 20090113825 A	02-11-2009
		TW 200838437 A	01-10-2008
		TW 201350024 A	16-12-2013
		US 2009281283 A1	12-11-2009
		US 2013295646 A1	07-11-2013
		WO 2008099077 A2	21-08-2008
EP 2687595 A1	22-01-2014	EP 2687595 A1	22-01-2014
		WO 2014013024 A1	23-01-2014
US 2006179500 A1	10-08-2006	US 2003005468 A1	02-01-2003
		US 2006179500 A1	10-08-2006
WO 2010149907 A1	29-12-2010	AR 077234 A1	10-08-2011
		AU 2010264369 A1	19-01-2012
		CA 2764779 A1	29-12-2010
		CN 102458455 A	16-05-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2014/062051

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2445516 A1	02-05-2012
		FR 2947181 A1	31-12-2010
		JP 2012530770 A	06-12-2012
		KR 20120047918 A	14-05-2012
		US 2012087908 A1	12-04-2012
		WO 2010149907 A1	29-12-2010

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2014/062051

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K38/36 A01K67/027 C07K14/745 C12N9/64 A61P7/04
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K A01K C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	G. CHEVREUX ET AL: "N-/O-glycosylation analysis of human FVIIa produced in the milk of transgenic rabbits", GLYCOBIOLOGY, vol. 23, no. 12, 2 octobre 2013 (2013-10-02), pages 1531-1546, XP055090715, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/glycob/cwt085 le document en entier	1-15
A	EP 0 527 063 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 10 février 1993 (1993-02-10) cité dans la demande le document en entier	1-12

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
24 juillet 2014	01/08/2014

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hars, Jesko

2

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 901 707 A1 (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 7 décembre 2007 (2007-12-07) cité dans la demande le document en entier	1,10-20
X	WO 2008/099077 A2 (LFB BIOTECHNOLOGIES [FR]; NOGRE MICHEL [FR]; LEJARS ALAIN [FR]; OLLIVI) 21 août 2008 (2008-08-21) le document en entier	1,10-14, 16-20
X,P	EP 2 687 595 A1 (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 22 janvier 2014 (2014-01-22) cité dans la demande le document en entier	1-20
Y	US 2006/179500 A1 (MEADE HARRY M [US] ET AL) 10 août 2006 (2006-08-10) alinéas [0068], [0076], [0099], [0100]; figure 1	15
Y	MAKSIMENKO O G ET AL: "Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems.", ACTA NATURAE JAN 2013, vol. 5, no. 1, janvier 2013 (2013-01), pages 33-46, XP05513122, ISSN: 2075-8251 le document en entier	15
Y	YANN ECHELARD ET AL: "Transgenic Technology: a Validated Approach for Large-Scale Manufacturing", IPT ONLINE, vol. 29, 11 juin 2009 (2009-06-11), pages 50-54, XP055131254, le document en entier	15
X	Anonymous: "GTC BIOTHERAPEUTICS REPORTS THIRD QUARTER 2007 FINANCIAL RESULTS for rEVO Biologics, Inc. (GTCB)", , 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 1-16, XP055131257, Extrait de l'Internet: URL:http://www.wikinvest.com/stock/GTC_Biotherapeutics_(GTCB)/Gtc_Biotherapeutics_Reports_2007_Financial_Results [extrait le 2014-07-23] page 14	15
X	WO 2010/149907 A1 (LFB BIOTECHNOLOGIES [FR]; BARDAT ANNIE [FR]; POMPE CORNELIUS [FR]) 29 décembre 2010 (2010-12-29) page 14, alinéa 1	1,10-14, 16-20

2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2014/062051

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0527063 A1	10-02-1993	AT 248221 T	15-09-2003
		CA 2111238 A1	23-12-1992
		DE 69233173 D1	02-10-2003
		DE 69233173 T2	27-05-2004
		DK 0527063 T3	22-12-2003
		EP 0527063 A1	10-02-1993
		ES 2206444 T3	16-05-2004
		FR 2677652 A1	18-12-1992
		JP 3824632 B2	20-09-2006
		JP H06508515 A	29-09-1994
		PT 527063 E	30-01-2004
		WO 9222644 A1	23-12-1992
FR 2901707 A1	07-12-2007	AR 061430 A1	27-08-2008
		AU 2007266952 A1	06-12-2007
		BR PI0710706 A2	16-08-2011
		CA 2652496 A1	06-12-2007
		CA 2820391 A1	06-12-2007
		CN 101460189 A	17-06-2009
		CN 103408655 A	27-11-2013
		EP 2037955 A2	25-03-2009
		FR 2901707 A1	07-12-2007
		JP 2009538885 A	12-11-2009
		JP 2013177440 A	09-09-2013
		KR 20090031676 A	27-03-2009
		TW 200817032 A	16-04-2008
		US 2009311239 A1	17-12-2009
		US 2014093491 A1	03-04-2014
		WO 2007138199 A2	06-12-2007
WO 2008099077 A2	21-08-2008	AR 064683 A1	22-04-2009
		AU 2008214544 A1	21-08-2008
		BR PI0805838 A2	30-08-2011
		CA 2673583 A1	21-08-2008
		CN 101600358 A	09-12-2009
		CN 103910778 A	09-07-2014
		EP 2134191 A2	23-12-2009
		FR 2910786 A1	04-07-2008
		IL 199360 A	30-05-2013
		JP 5196590 B2	15-05-2013
		JP 2010514746 A	06-05-2010
		KR 20090113825 A	02-11-2009
		TW 200838437 A	01-10-2008
		TW 201350024 A	16-12-2013
		US 2009281283 A1	12-11-2009
		US 2013295646 A1	07-11-2013
		WO 2008099077 A2	21-08-2008
EP 2687595 A1	22-01-2014	EP 2687595 A1	22-01-2014
		WO 2014013024 A1	23-01-2014
US 2006179500 A1	10-08-2006	US 2003005468 A1	02-01-2003
		US 2006179500 A1	10-08-2006
WO 2010149907 A1	29-12-2010	AR 077234 A1	10-08-2011
		AU 2010264369 A1	19-01-2012
		CA 2764779 A1	29-12-2010
		CN 102458455 A	16-05-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2014/062051

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		EP 2445516 A1	02-05-2012
		FR 2947181 A1	31-12-2010
		JP 2012530770 A	06-12-2012
		KR 20120047918 A	14-05-2012
		US 2012087908 A1	12-04-2012
		WO 2010149907 A1	29-12-2010