

(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
12 mars 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/030866 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 1/18 (2006.01) A61K 38/36 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet
HARLE et PHELIP, 7, rue de Madrid, 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/051543

(22) Date de dépôt international : 28 août 2008 (28.08.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0757266 30 août 2007 (30.08.2007) FR

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

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
LFB-BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; 3, avenue des
Tropiques, ZA de Courtaboeuf, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : POULLE,
Michel [FR/FR]; 1, rue Léon Gambetta, F-59136 Wavrin
(FR). BONNEEL, Patrick [FR/FR]; 25, rue Kant,
F-59000 Lille (FR).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

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

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING THE FACTOR VIII AND THE VON WILLEBRAND FACTOR

(54) Titre : PROCEDE DE PURIFICATION DU FACTEUR VIII ET DU FACTEUR VON WILLEBRAND

(57) Abstract: The invention relates to a purification method that comprises, from a solution selected from (i) a solution containing a mixture of FVIII and FvW, (ii) a solution containing FvW, (iii) a solution resulting from a secretion of a non-human animal and (iv) a solution resulting from a vegetable extract containing FVIII, the step of absorbing the FVIII or the FvW on an ion-exchange chromatography filtration membrane.

(57) Abrégé : Le procédé de purification comprend, à partir d'une solution choisie parmi (i) une solution contenant un mélange de FVIII et FvW, (ii) une solution contenant du FvW, (iii) une solution issue d'une sécrétion d'un animal non-humain et (iv) une solution issue d'un extrait végétal contenant du FVIII, une étape d'absorption du FVIII ou du FvW sur une membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions.



WO 2009/030866 A2

Procédé de purification du facteur VIII et du facteur Von Willebrand**DOMAINE DE L'INVENTION**

5 La présente invention se rapporte au domaine de la purification du facteur VIII et du facteur Von Willebrand, pour leur utilisation comme principe actif de médicament.

ART ANTERIEUR

10 Le facteur VIII (ci-après aussi désigné « FVIII ») est une protéine plasmatique présente en faible concentration dans le plasma humain. Pourtant, elle constitue le point central de la cascade de la coagulation. En effet, cette protéine agit comme cofacteur du facteur IX (ou « FIX ») afin d'activer le facteur X (ou « FX »). Une fois activé, le facteur X convertit la prothrombine en thrombine, qui elle-même convertit le fibrinogène en fibrine, aboutissant à la formation du caillot de fibrine hémostatique.

15 Les individus atteints d'hémophilie A présentent un déficit en FVIII, qui engendre des hémorragies profuses, soit spontanément, soit à la suite d'un traumatisme d'origine accidentel ou chirurgical.

20 Ces individus sont traditionnellement traités par injection de FVIII plasmatique purifié. Ces injections étant souvent nombreuses et répétées, il est essentiel de disposer de concentrés de FVIII de haute pureté. En effet, si les concentrés de FVIII sont insuffisamment purifiés, ils peuvent contenir des quantités importantes de fibrinogène et d'immunoglobulines, susceptibles d'induire des réponses immunitaires indésirables.

25 La mise à disposition de protéines plasmatiques pour leur utilisation à des fins thérapeutiques nécessite donc des techniques de purification du FVIII plasmatique permettant d'obtenir des produits de haute pureté.

30 Les concentrés de Facteur VIII sont le plus souvent préparés à partir d'une fraction de plasma humain cryoprécipité. La pureté des concentrés de Facteur VIII généralement obtenus dans les centres industriels de traitement du plasma humain est souvent de l'ordre de 1 UI/mg et n'excède généralement pas les limites de 10 à 20 UI/mg. Les techniques de production classiques font appel à des étapes de précipitation qui visent à éliminer, souvent très imparfaitement, les contaminants protéiques tels que le fibrinogène, la fibronectine, et les immunoglobulines. Ces techniques peuvent utiliser ou combiner une précipitation à faible température (10°C), ou l'adjonction d'agents de précipitation des protéines ; ainsi des polymères hydrophiles tels que le PEG (Newman et al., Br. J. Haematol 21:1-20, 1971 ; Hao et al. , in Methods of Plasma Protein Fractionation, Academic Press 1980, pp.57-74), la polyvinylpyrrolidone (Casillas et

Simonetti, Br. J. Haemato, 50:665-672, 1982), le dextran, le Ficoll, le Percoll, l'amidon hydroxyéthylé et l'alumine ont été proposés comme agents de précipitation. Il en est de même de l'usage de glycolle et de chlorure de sodium préconisé par Thorell et Blombäck (Thorell et Blombäck, Thromb Res. 1984 Aug 15;35(4):431-50). De la même façon, certains auteurs (Ng et al, Thrombosis Res.,42:825-834, 1986) ont réussi à combiner trois agents de précipitation qui sont le PEG, le glycolle, et le chlorure de sodium pour obtenir des concentrés de Facteur VIII à activité spécifique comprise entre 10 et 16 UI/mg.

Des concentrés de Facteur VIII ont été produits également en intégrant au protocole de production un contact avec des billes de silice poreuse destinées à emprisonner les contaminants protéiques de faible poids moléculaire (Margolis et al., Vox Sang. 46:341-348,1984). L'activité spécifique du produit reste relativement faible : 1UI/mg.

Des techniques sont apparues dans la préparation de concentrés de Facteur VIII de très haute pureté. Ainsi des concentrés obtenus par des méthodes de chromatographie d'immunoaffinité ont été proposés (Zimmerman et Fulcher, Thrombosis Res., Suppl. VII, p. 58, 1987 ; Berntorp et Nilsson, Thrombosis Res., Suppl. VII, p.60, 1987 ; Levine et al., Thrombosis Res, Suppl. VII, 1987). Ces techniques consistent à purifier le Facteur VIII à l'aide d'anticorps anti-Facteur VIII:C ou anti-facteur von Willebrand immobilisés sur un support chromatographique. Ces techniques sont performantes mais exigent l'emploi de solutions drastiques pour désorber le Facteur VIII soit de son anticorps soit du facteur von Willebrand. Une étape supplémentaire d'ultrafiltration visant à éliminer les agents chimiques indésirables est donc nécessaire mais elle peut nuire à l'activité biologique du Facteur VIII. L'activité spécifique du Facteur VIII peut atteindre 4000 à 10000 UI/mg en cours de production, mais sa fragilité exige l'adjonction d'un stabilisant, tel que l'albumine, avant l'étape de lyophilisation, ce qui réduit l'activité spécifique du Facteur VIII à 3 à 5 UI/mg. L'inconvénient majeur de la purification par immunoaffinité est néanmoins la présence d'anticorps résiduels ; ceux-ci étant d'origine animale , ils peuvent entraîner chez les malades l'apparition de réactions immunologiques vis-à-vis de ces protéines étrangères à l'organisme humain.

Ainsi, toutes ces techniques ne permettent pas de disposer de concentrés de Facteur VIII de très haute pureté, totalement dépourvus de protéines d'origine étrangère telles que des anticorps d'origine animale, au moyen de procédés applicables à l'échelle industrielle.

Le document EP 0 343 275 décrit un procédé de préparation de Facteur VIII à partir d'un cryoprécipité qui se caractérise en ce que, précédemment au traitement d'inactivation virale, on met en suspension le cryoprécipité dans de l'eau contenant 1 à 3 U/ml d'héparine à pH 6,5-7,5, on fait réagir avec une suspension d'hydroxyde d'aluminium et

après refroidissement à 10-18°C et ajustage du pH à 6-7, on centrifuge ou on filtre puis on poursuit la purification par un traitement ultérieur, en particulier par chromatographie sur une résine échangeuse d'ions telle que Fractogel-DEAE (aujourd'hui dénommée DEAE-TOYOPEARL®, commercialisée par Tosoh Bioscience), de type hydrophile.

5 Ce document décrit donc la purification du seul Facteur VIII par l'association d'une étape préliminaire très particulière, se caractérisant notamment par l'absence totale de traitement éthanolique, avec une chromatographie d'échange d'ions sur une résine hydrophile telle que Fractogel DEAE.

10 Le document EP 0 359 593 décrit un procédé de purification par chromatographie d'échange d'anions, qui permet de séparer sur une seule colonne chromatographique les protéines recherchées dans des conditions suffisamment ménagées pour rendre inutiles les traitements ultérieurs.. Ce procédé permet la séparation des protéines Facteur VIII, fibrinogène, fibronectine et de facteur von Willebrand du plasma humain ou animal. Ce procédé peut être résumé ainsi : on soumet la fraction du cryoprécipité resolubilisée dans
15 l'eau à une séparation unique par voie chromatographique sur une résine échangeuse d'anions dont la matrice est un gel de type polymère vinylique macroréticulé capable, de par ses propriétés de porosité, de retenir le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand, puis on récupère sélectivement les différentes protéines par des augmentations successives de la force ionique du tampon d'élution. Ce procédé donne des résultats
20 satisfaisants en utilisant des groupements DEAE greffés sur une résine Fractogel® TSK-DEAE 650 (aujourd'hui dénommée DEAE-TOYOPEARL®, commercialisée par Tosoh Bioscience) . Toutefois, ce procédé, s'il permet d'obtenir un FVIII purifié, ne permet pas d'obtenir un facteur Von Willebrand suffisamment purifié.

Or, le facteur Von Willebrand (ci-après aussi désigné « FvW ») joue un rôle
25 essentiel dans l'hémostase par deux fonctions distinctes : comme protéine d'adhésion, il permet la dispersion, l'adhérence et l'agrégation des plaquettes sanguines sur le sous-endothelium vasculaire, et participe ainsi au processus de cicatrisation rapide des vaisseaux lésés et, d'autre part, il assure la stabilisation et le transport du Facteur VIII dans la circulation sanguine, auquel il est associé de manière non covalente.

30 Une déficience congénitale en FvW ou une anomalie structurale de ce facteur entraîne la maladie de Willebrand qui se manifeste par des hémorragies cutanées et des muqueuses. Cette maladie est très hétérogène dans son expression clinique et pose de graves problèmes en cas d'intervention chirurgicale. Le traitement de la maladie de Willebrand s'impose pour corriger les anomalies de l'hémostase primaire (temps de
35 saignement) et de la coagulation.

La maladie se traite traditionnellement par thérapie de substitution par des dérivés de plasma humain enrichis en FvW (par exemple la fraction cryoprécipitée du plasma ou des concentrés de Facteur VIII contenant suffisamment de FvW associé à celui-ci).

Or, le FvW est une protéine difficile à purifier. En effet, le facteur Von Willebrand est la plus grosse protéine connue en circulation dans le plasma. Elle est constituée d'un ensemble de multimères liés par des ponts disulfure, dont l'élément de base a un poids moléculaire voisin de 260 kilodaltons (kDa). La plus petite forme de FvW, dans le plasma, est un dimère de 440-500 kDa et les formes les plus grandes sont des multimères de ce dimère dont le poids moléculaire peut atteindre 20 millions de daltons. Cet assemblage des sous-unités en multimères peut être spécifique des cellules dans lesquelles il est opéré, le FvW étant synthétisé et polymérisé dans les mégacaryocytes et dans les cellules endothéliales.

Ainsi, la complexité de la molécule du facteur von Willebrand, ainsi que sa liaison avec le FVIII, rend sa préparation très difficile.

Divers procédés de préparation de concentrés de FvW associent typiquement des étapes de précipitation d'une fraction de plasma, destinée à l'élimination de la majeure partie des protéines indésirables (fibrinogène, fibronectine etc.), et/ou de chromatographies (échange d'ions, d'affinité, d'immunoaffinité, d'exclusion stérique etc.) qui visent à l'obtention de concentrés de très grande pureté, présentant une activité spécifique élevée, et qui permettent de conserver l'intégrité des formes multimériques, notamment celles de haut poids moléculaire dont l'importance biologique est fondamentale dans les processus de cicatrisation.

Le brevet EP 0 503 991 divulgue un procédé de préparation à l'échelle industrielle d'un concentré de FvW comprenant une étape de prépurification d'une fraction cryoprécipitée de plasma et trois étapes successives de chromatographie, la troisième étant une chromatographie d'affinité sur colonne de gélatine immobilisée sur agarose. Le concentré de FvW ainsi obtenu présente une activité spécifique supérieure à 100 VWF : RCo/mg exprimée en unités d'activité de cofacteur de ristocétine par mg de protéines et un taux de multimères de hauts poids moléculaire comparable à celui du plasma de départ.

La demande de brevet EP 0 934 748 décrit un procédé de préparation de FvW comprenant la combinaison de chromatographies d'échange d'anions et d'échange de cations. Les fractions de FvW obtenues présentent une activité spécifique supérieure à 100 UI FvW:Ag/mg exprimée en unités d'antigène de FvW par mg de protéine, mais contiennent des proportions encore notables de Facteur VIII.

Le brevet US 6 579 723 décrit un procédé de préparation d'un FvW hautement purifié par chromatographie d'immunoaffinité dont les immunoadsorbants représentent des anticorps anti-FvW. Il peut également être prévu une étape supplémentaire de purification

par chromatographie d'affinité sur héparine. Toutefois, l'inconvénient d'une purification par immunoaffinité est la présence éventuelle d'anticorps résiduels pouvant entraîner des réactions immunologiques.

5 Le brevet EP 0 383 234 enseigne la préparation d'un concentré de FvW par une chromatographie d'échange d'anions, mise en oeuvre avec des solutions acides (pH de 5,5 à 6,5) contenant des hydrates de carbone, pour la fixation du Facteur VIII sur l'échangeur d'anions. La récupération conjointe du FvW, de la fibronectine et du fibrinogène non retenus, par lavage du support, nécessite des étapes supplémentaires de précipitation pour l'isolement d'un concentré de FvW purifié.

10 Le document EP 1 632 501 décrit un procédé de préparation d'un concentré de facteur von Willebrand de très haute pureté à partir d'une fraction biologique contenant du facteur von Willebrand, comprenant une séparation par chromatographie d'échange d'anions utilisant un support de polymère vinylique, de type base faible. Ce procédé possède l'avantage d'être de mise en oeuvre très simple, permettant d'aboutir à un facteur
15 Von Willebrand de haute activité spécifique et contenant très peu de facteur VIII.

Le FVIII et le FvW sont des protéines plasmatiques très importantes, et leur déficience chez certains individus entraîne des troubles graves de l'hémostase. C'est pourquoi il est de première importance de mettre au point des procédés de préparation de ces protéines, permettant d'obtenir des produits de pureté adaptée à leur utilisation
20 répétée chez les patients.

Les procédés décrits dans l'art antérieur permettent soit d'obtenir un facteur VIII de bonne pureté, mais un facteur Von Willebrand de pureté insuffisante, soit d'obtenir un FVIII et un FvW de bonne pureté, mais au prix d'un procédé complexe à mettre en oeuvre.

25 **RESUME DE L'INVENTION**

L'invention a pour objet un procédé de purification d'une solution contenant un mélange de FVIII et de FvW, ou d'une solution contenant du FvW ou d'une solution issue d'une sécrétion d'un animal, en particulier non-humain, ou d'un extrait végétal contenant
30 du FVIII, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur une membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions permettant d'adsorber au moins une protéine choisie parmi le FVIII et le FvW.

35 **DESCRIPTION DE L'INVENTION**

Ainsi, l'invention a pour objet un procédé de purification de FVIII ou de FvW à partir d'une solution choisie parmi (i) une solution contenant un mélange de FVIII et de FvW, (ii)

une solution contenant du FvW, (iii) une solution issue d'une sécrétion d'un animal non-humain et (iv) une solution issue d'un extrait végétal contenant du FVIII, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'adsorption du FVIII ou du FvW sur une membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions.

5

Par « procédé de purification », on désigne un procédé permettant de séparer le FVIII des autres molécules contenues dans le milieu, ou un procédé permettant de séparer le FvW des autres molécules contenues dans le milieu, ou un procédé permettant de séparer le FVIII du FvW, ou un procédé permettant de séparer les complexes FVIII/FvW
10 des autres molécules contenues dans le milieu. Ces molécules peuvent être des protéines différentes du FVIII et du FvW, des virus, des bactéries, des spores, du milieu de culture, du sérum de veau foetal, cette liste n'étant pas limitative.

Par « FVIII », on désigne toute forme de FVIII, notamment capable d'agir en tant que cofacteur dans l'activation du FIX et possédant la capacité de former un complexe
15 avec le FvW, notamment le FVIII mature, les dérivés biologiquement actifs du FVIII mature, tels que le pro-FVIII qui contient le pro-peptide (pro-FVIII), les construits protéiques comprenant le FvW immature, le précurseur du FVIII (pré-pro-FVIII), le FVIII mature obtenu après clivage du peptide signal et du pro-peptide. D'autres dérivés biologiquement actifs du FVIII inclus dans l'invention sont des pro-drogues qui subissent des modifications post-
20 traductionnelles ou qui sont converties en formes biologiquement actives, comme les formes tronquées, les formes délétées, par exemple le FVIII délété d'un ou plusieurs acides aminés situés dans la région entre Arg-759 et Ser-1709 décrit dans le document EP 218 712, les formes chimériques, et les formes qui possèdent des modifications post-
25 traductionnelles différentes des formes matures naturelles plasmatiques. Ces différentes formes de FVIII peuvent par exemple être fabriquées par modification du FVIII mature ou de toute autre forme naturellement présente dans le sang. La séquence nucléotidique codant pour un tel FVIII peut provenir de différentes sources, de préférence mammifère, incluant les versions humaines, porcines, ovines, bovines, équines, caprines, cette liste n'étant pas limitative.

Par « FvW », on désigne toute forme de FvW, notamment le FvW mature, les dérivés biologiquement actifs du FvW mature, tels que le pro-FvW qui contient le pro-peptide, les construits protéiques comprenant le FvW immature, comprenant le précurseur du FvW (pré-pro-FvW), le propeptide du FvW (pro-FvW), le FvW mature obtenu après
30 clivage du peptide signal et du pro-peptide. D'autres dérivés biologiquement actifs du FvW inclus dans l'invention sont des pro-drogues qui subissent des modifications post-
35 traductionnelles ou qui sont converties en formes biologiquement actives, comme les formes tronquées, les formes délétées, par exemple le FvW dépourvu de domaine A2, et

résistant à la protéolyse (Lankhof et al., Thromb. Haemost. 77 : 1008-1013, 1997), le fragment de FvW allant de Val 449 à l'Asn 730 incluant le domaine de liaison à la glycoprotéine 1b et les sites de liaison pour le collagène et l'héparine (Pietu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164 : 1339-1347, 1989), les formes chimériques, et les
5 formes qui ont des modifications post-traductionnelles différentes des formes matures naturelles plasmatiques. Ces différentes formes de FvW peuvent par exemple être fabriquées par modification du FvW mature ou de toute autre forme naturellement présente dans le sang. La séquence nucléotidique codant pour un tel FvW peut provenir de différentes sources, de préférence mammifère, incluant les versions humaines, porcines,
10 ovines, bovines, équines, caprines, cette liste n'étant pas limitative.

Par « solution contenant un mélange de FVIII et de FvW », on désigne toute solution contenant du FVIII et du FvW, sous forme complexée ou séparée. Ces solutions peuvent être d'origine recombinante, transgénique ou plasmatique.

Dans le cas où la solution est d'origine recombinante, elle est issue d'un système
15 unicellulaire, dans lequel on a induit l'expression des protéines de FVIII et de FvW. A titre d'exemple, on peut citer toutes les lignées cellulaires animales ou humaines transfectées à l'aide d'un vecteur contenant le gène codant pour chacune de ces protéines, de préférence le gène codant pour la protéine humaine, lesdites lignées pouvant être sélectionnées notamment parmi les lignées CHO-K, CHO-LeC10, CHO Lec-1, CHO Pro-5, CHO dhfr-,
20 Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, YB2/0 (ATCC CRL-1662), BHK, K61-16, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8. 653, SK-Hep, HepG2, PERC6 (Crucell), ainsi que les cellules de plantes, les systèmes bactériens, par exemple E. Coli, les systèmes fongiques, les systèmes utilisant des virus, notamment des baculovirus, cette liste n'étant pas limitative.

De tels systèmes cellulaires expriment les protéines de FvW et FVIII au moyen de
25 techniques bien connues de l'homme du métier. On peut citer par exemple le document US 5,198,349, dont le contenu est incorporé par référence, qui décrit la co-expression du FVIII et du FvW, notamment dans des cellules CHO co-transfectées avec d'une part un vecteur d'expression dans lequel la séquence du FVIII a été insérée, et d'autre part un
30 vecteur d'expression dans lequel a été insérée la séquence codante du FvW.

Dans le cas où la solution est d'origine transgénique, elle est issue d'un système pluricellulaire, notamment un animal ou une plante obtenu par transgénèse, c'est-à-dire dans lesquels une ou plusieurs cellules ont reçu une molécule d'ADN recombinant . A titre d'exemple on peut citer les chiens, les chats, les souris, les rats, le hamster, les vaches,
35 les chèvres, les moutons, les lapins et les porcs, les chevaux, les insectes, les plantes, par exemple le tabac, le soja, cette liste n'étant pas limitative.

Dans le cas des animaux produisant le FVIII et le FvW, cette production peut avoir lieu dans divers milieux sécrétés par l'animal, par exemple l'urine, le sang, la salive ou le lait, cette liste n'étant pas limitative. De telles méthodes de production peuvent être réalisées au moyen de techniques bien connues de l'homme du métier. On peut citer par exemple le document EP 0 741 515 et le document EP 807 170, cette liste n'étant pas limitative. Ce dernier décrit la production d'un animal transgénique ayant intégré de manière stable dans son génome les molécules d'ADN codant pour le FVIII et le FvW, de manière à les exprimer toutes deux et à les sécréter dans leur lait.

Dans le cas des plantes produisant le FVIII et le FvW, cette production peut être réalisée au moyen de techniques bien connues de l'homme du métier, comme par exemple les documents US 6,331,416 et US 5,994,628, cette liste n'étant pas limitative.

Dans le cas où la solution est d'origine plasmatique, elle peut être soit du plasma, animal ou humain, soit du cryoprécipité, ou une fraction obtenue par des méthodes de fractionnement classiques (Cohn et al., J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 et Kistler et al., Vox Sang., 7, 1962, 414-424). Ces fractions peuvent éventuellement avoir subi un traitement de prépurification tel que par adsorption sur hydroxyde d'aluminium.

Le mélange de FVIII et de FvW implique que ces protéines peuvent être en proportions environ égales, ou bien qu'une protéine est présente de manière majoritaire, voire très majoritaire, par rapport à l'autre.

Par « solution contenant du FvW », on désigne toute solution contenant du FvW, et essentiellement dépourvue, c'est-à-dire contenant peu, voire très peu, de FVIII. Cette solution peut être d'origine recombinante, transgénique ou d'origine plasmatique.

Dans le cas où la solution est d'origine recombinante, elle est issue d'un système unicellulaire, dans lequel on a induit l'expression de la protéine de FvW. A titre d'exemple, on peut citer toutes les lignées cellulaires animales ou humaines transfectées à l'aide d'un vecteur contenant le gène codant pour cette protéine, de préférence le gène codant pour la protéine humaine, lesdites lignées pouvant être sélectionnées notamment parmi les lignées CHO-K, CHO-LeC10, CHO Lec-1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, YB2/0, BHK, K61-I6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8. 653, SK-Hep, HepG2, ainsi que les cellules de plantes, les systèmes bactériens, par exemple E. Coli, les systèmes fongiques, les systèmes utilisant des virus, notamment des baculovirus, cette liste n'étant pas limitative.

De tels systèmes cellulaires expriment la protéine de FvW et peuvent être obtenues au moyen de techniques bien connues de l'homme du métier. On peut citer par exemple les documents US 5,198,349 et WO 89/06096, cette liste n'étant pas limitative. Le document US 5,198,349 décrit ainsi l'expression du FvW humain dans des cellules COS,

au moyen de l'insertion du cDNA codant pour le FvW humain dans un vecteur d'expression.

Dans le cas où la solution est d'origine transgénique, elle est issue d'un système pluricellulaire, notamment un animal ou une plante obtenu par transgénèse, c'est-à-dire dans lesquels une ou plusieurs cellules ont reçu une molécule d'ADN recombinant codant pour le FvW. A titre d'exemple on peut citer les chiens, les chats, les souris, les rats, les vaches, les chèvres, les moutons, les lapins et les porcs, les insectes, les plantes, par exemple le tabac, le soja, cette liste n'étant pas limitative.

Dans le cas des animaux transgéniques produisant le FvW, cette production peut avoir lieu dans divers milieux sécrétés par l'animal, par exemple l'urine, le sang, la salive ou le lait, cette liste n'étant pas limitative. De telles méthodes de production peuvent être réalisées au moyen de techniques bien connues de l'homme du métier. On peut citer par exemple les documents WO 2001/022810 et WO1999/058699, cette liste n'étant pas limitative. A cet égard, le document WO 2001/022810 décrit la réalisation de souris transgéniques produisant du FvW humain dans le lait des femelles.

Dans le cas des plantes produisant le FVIII et le FvW, cette production peut être réalisée au moyen de techniques bien connues de l'homme du métier, comme par exemple les documents US 6,331,416 et US 5,994,628, cette liste n'étant pas limitative.

Dans le cas où la solution est d'origine plasmatique, elle peut être une fraction de plasma animal ou humain, soit du cryoprécipité, ou une fraction obtenue, obtenu par des méthodes de fractionnement classiques (Cohn et al., J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 et Kistler et al., Vox Sang., 7, 1962, 414-424). Ces fractions peuvent éventuellement avoir subi un traitement de prépurification tel que par adsorption sur hydroxyde d'aluminium.

Par « solution issue d'une sécrétion d'un animal non-humain contenant du FVIII », on désigne toute solution issue de toute sécrétion, par exemple du plasma, de la salive, de l'urine ou du lait, produite par un animal transgénique fabriqué de manière à ce qu'il exprime une molécule de FVIII dans une des sécrétions citées précédemment. Dans ce cas, le FvW n'est pas exprimé par l'animal transgénique. Par « solution issue du plasma contenant du FVIII », on désigne également toute solution issue du plasma contenant naturellement du FVIII, humain ou animal, et essentiellement débarrassée de FvW. Elle peut être issue d'une fraction de plasma animal ou humain, soit du cryoprécipité, ou une fraction obtenue par des méthodes de fractionnement classiques (Cohn et al., J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 et Kistler et al., Vox Sang., 7, 1962, 414-424). Ces fractions peuvent éventuellement avoir subi un traitement de prépurification tel que par adsorption sur hydroxyde d'aluminium.

Des méthodes de production de sécrétions d'un animal transgénique peuvent être réalisées au moyen de techniques bien connues de l'homme du métier. On peut citer par

exemple les documents US 5,880,327 et US2007/0011752, cette liste n'étant pas limitative. A cet égard, le document US 5,880,327 décrit la production de FVIII humain dans le lait d'une souris transgénique. Le document US2007/0011752 décrit la production de protéines humaines, par exemple le FVIII, dans la salive de différents animaux.

5 Par « solution issue d'un extrait végétal contenant du FVIII », on désigne toute fraction d'un végétal renfermant des protéines de FVIII, notamment humain, produit dans une plante ou une cellule de plante transgénique fabriquée de manière à ce qu'il exprime une molécule de FVIII.

10 Un tel extrait peut être fabriqué par introduction dans une cellule de plante d'un vecteur nucléotidique contenant le gène codant pour le FVIII. De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier, et peuvent être illustrées par de nombreux documents de l'état de la technique, comme par exemple le document US 2005/0060775.

15 Par « membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions » on désigne toute barrière physique semi-perméable, possédant la capacité d'adsorber le FVIII et/ou le FvW par échange d'ions lorsque ces protéines sont entraînées à travers la membrane. De plus, cette membrane possède la capacité de laisser passer le FVIII et le FvW lorsque l'interaction par échange d'ions entre la membrane et le FVIII et/ou le FvW n'est plus suffisante pour les retenir sur la membrane.

20 Ainsi, pour mettre en œuvre le procédé de purification de FVIII ou de FvW de l'invention, on utilise une membrane filtrante échangeuses d'ions constituée d'un support macroporeux comprenant, immobilisé sur ledit support, un revêtement chargé négativement ou positivement, ledit revêtement conférant à la membrane filtrante les propriétés d'échange d'ions. En général, le revêtement chargé négativement ou positivement est immobilisé sur le support macroporeux par greffage chimique.

25 Le support macroporeux possède une porosité, c'est-à-dire une taille moyenne de pores, telle que la membrane filtrante permet de laisser passer le FVIII et le FvW. Un premier avantage lié à l'utilisation d'une telle membrane est la possibilité d'utiliser des membranes filtrantes échangeuses à usage unique, ce qui accroît le niveau de sécurité sanitaire du procédé. Un second avantage lié à l'utilisation d'une telle membrane est la
30 possibilité de réaliser le procédé de purification de l'invention, et plus précisément le ou les étape(s) de chromatographie d'échange d'ions, avec un débit très élevé de la solution à purifier.

35 Tout type de support barrière physique peut convenir pour une membrane filtrante adaptée à la mise en œuvre de l'invention, par exemple, un film polymère, réseau capillaire, fibre creuse, cellulose stabilisée, polyéthersulfone, ou toute structure tridimensionnelle ayant la capacité de laisser passer le FVIII et le FvW.

L'interaction par échange d'ions entre la membrane filtrante et les protéines de FVIII et de FvW sont dues au revêtement chargé positivement ou négativement qui est immobilisé sur le support macroporeux, ledit revêtement possédant des groupements fonctionnels basiques ou acides qui peuvent être échangés.

5 Le revêtement échangeur d'ions peut être de type monofonctionnel, c'est-à-dire comportant seulement une variété de groupement fonctionnel, ou de type polyfonctionnel s'il comporte différents types de groupements fonctionnels.

Ainsi, la membrane filtrante permet une capture, ou adsorption, simultanée des protéines de FVIII et de FvW, grâce à l'interaction entre ces protéines et la membrane.
10 Lors de l'application d'une solution contenant du FVIII et du FvW sur la membrane, le FvW et le FVIII sont retenus par la membrane grâce à des interactions par échange d'ions.

Dans le cas où les produits à purifier ne sont pas contenus dans du cryoprécipité, il est préférable de réaliser une étape de pré-purification de la solution à purifier avant la mise en œuvre du procédé de purification de l'invention, afin d'obtenir une solution
15 suffisamment débarrassée des impuretés.

Cette étape de pré-purification peut être avantageuse notamment dans le cas des solutions complexes, par exemple issues du lait ou du plasma, qui est un milieu contenant de nombreuses protéines. Une telle étape de pré-purification peut notamment comprendre une étape de clarification, par exemple telle que décrite dans le document WO
20 2004/076695, ou une étape d'extraction telle que décrite par exemple dans les documents FR 06 04864 ou FR 06 11536, cette liste n'étant pas limitative. A cet égard, le document FR 06 04864 décrit un procédé d'extraction d'au moins une protéine présente dans du lait, ladite protéine présentant une affinité pour les ions calcium complexés ou non dudit lait, comprenant les étapes suivantes consistant à :

- 25 (i) libérer la protéine par la précipitation de composés de calcium obtenue par mise en contact du lait avec un sel soluble, par exemple le phosphate de sodium, dont l'anion est choisi pour son aptitude à former dans un tel milieu lesdits composés de calcium insolubles, pour ainsi obtenir une phase liquide enrichie en la protéine,
(ii) séparer la phase liquide enrichie en la protéine du précipité de composés de
30 calcium, ladite phase liquide étant en outre séparée en une phase lipidique et en une phase aqueuse non lipidique comprenant la protéine, et
(iii) récupérer la phase aqueuse non lipidique comprenant la protéine.

Par ailleurs, le document FR 06 11536 décrit un procédé d'extraction d'une protéine présente dans du lait, présentant au moins une poche hydrophobe et une charge négative
35 au pH naturel du lait, comprenant les étapes suivantes de:

- a) Ecrémage et délipidation dudit lait,

b) Passage de la fraction délipidée et écrémée contenant ladite protéine sur un support chromatographique sur lequel est greffé un ligand présentant à la fois un caractère hydrophobe et un caractère ionique, par exemple le 4-Mercapto-Ethyl-Pyridine dans des conditions de pH permettant à ladite protéine d'être retenue sur ledit support,

c) Elution de la protéine,

d) Purification de la fraction éluée par élimination des protéines du lait de ladite fraction éluée, et

e) Récupération de ladite protéine.

Dans le cas des solutions produites par un système cellulaire, l'étape de pré-purification peut être effectuée immédiatement après l'étape de culture cellulaire elle-même. La composition du milieu de culture cellulaire peut être contrôlée de manière à ce que les protéines produites par la cellule soient excrétées dans le milieu extra-cellulaire. Par ailleurs, le choix des cellules peut être effectué de manière à ce que la protéine produite soit excrétée dans le milieu.

Puis, une étape de filtration en profondeur ou une micro-filtration tangentielle peut convenir pour obtenir une pré-purification adaptée à la mise en œuvre des étapes du procédé de purification de l'invention.

Dans certains modes de réalisation particulier de l'invention, la membrane filtrante est une membrane échangeuse de cations. Les contre-ions positifs des groupements fonctionnels portés par la membrane sont échangés par des charges de même signe sur le FvW et le FvIII.

Parmi les groupements fonctionnels susceptibles d'être utilisés pour le revêtement échangeur de cations, on peut citer le carboxymétyl (CM), le phosphoryl et le sulfopropyl (SP), le sulfate (S), cette liste n'étant pas limitative.

Dans ces modes de réalisation utilisant une membrane filtrante échangeuse de cations, les tampons susceptibles d'être utilisés sont le Tris-hydroxyméthyl-aminométhane, le carbonate, l'éthylène diamine, l'imidazole ou la triéthanolamine, cette liste n'étant pas limitative.

Dans ces modes de réalisation, le pH du tampon sera choisi en fonction du point isoélectrique de la protéine, de manière à ce que la protéine soit à ce pH de charge globale positive, selon des techniques de routine bien connues de l'homme du métier.

Dans certains autres modes de réalisation de l'invention, la membrane filtrante mise en œuvre est une membrane échangeuse d'anions. Les contre-ions négatifs des groupements fonctionnels portés par la membrane sont échangés par des charges de même signe sur le FvW et le FVIII.

5 Parmi les groupements fonctionnels susceptibles d'être utilisés pour le revêtement échangeur d'anions, on peut citer le Diéthylaminoéthyl (DEAE), le Diéthyl (2-hydroxypropyl) aminoéthyl ou ammonium quaternaire (QAE, Q), le Diméthylaminoéthyl (DMAE) et le Triméthylaminoéthyl (TMAE), cette liste n'étant pas limitative. Dans ces modes de réalisation, les tampons susceptibles d'être utilisés sont l'acétate, le citrate, le phosphate, la glycine, le barbiturate, cette liste n'étant pas limitative.

Dans ces modes de réalisation, le pH du tampon sera choisi en fonction du point isoélectrique de la protéine, de manière à ce que la protéine soit à ce pH de charge globale négative, selon des techniques de routine bien connues de l'homme du métier.

De manière préférée, la membrane filtrante comprend un revêtement d'échange d'ions consistant en un échangeur anionique fort.

Par « échangeur anionique fort » on désigne toute membrane échangeuse d'anions capables d'adsorber des protéines faiblement ionisées.

De telles membranes filtrantes sont disponibles dans le commerce. A titre d'exemple, on peut citer les membranes portant des groupements QAE, Q, notamment la membrane Mustang Q® (Pall) ou la membrane Sartobind Q (Sartorius), cette liste n'étant pas limitative.

La membrane Mustang Q (Pall) est particulièrement avantageuse, car elle possède une grande capacité d'adsorption, des débits volumiques de chromatographie importants, une possibilité d'usage unique ou multi-cycle.

25 Par ailleurs, elle permet de s'affranchir des étapes de validations de nettoyage du support, telles que la régénération et la sanitisation (étude sécurisation virale, prions, cette liste n'étant pas limitative).

L'utilisation d'une telle membrane filtrante permet également de s'affranchir des études de vieillissement réalisées traditionnellement avec les supports classiques.

30 Ainsi, l'utilisation d'une telle membrane permet la réduction des temps de production par rapport à des procédés de l'état de la technique.

De manière préférée, la surface de la membrane filtrante en contact avec la solution à purifier comporte un revêtement échangeur d'anions comprenant des groupes ammonium quaternaires qui sont immobilisés sur le support macroporeux par greffage chimique.

35 Dans un autre mode de réalisation particulier, la membrane filtrante est de type macroporeux.

Par « macroporeux » on désigne un système de pores compris dans la membrane, dont la taille est comprise entre 0.3 μm et 1.0 μm . Préférentiellement, la taille des pores est comprise entre 0.5 μm et 0.9 μm . De manière particulièrement préférée, la taille des pores est de 0.8 μm .

5 Dans un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, le support de la membrane est en polyéthersulfone.

A titre d'exemple, une telle membrane en polyéthersulfone peut être une membrane Mustang Q®, distribuée par Pall. Cette membrane possède des pores de taille 0.8 μm , et elle est greffée avec des groupements amines quaternaires.

10 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la solution à purifier contient du FVIII ou du FvW, et est d'origine plasmatique.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la solution à purifier contient un mélange de FVIII et de FvW, et est préférentiellement d'origine plasmatique.

15 Ainsi, dans ces modes de réalisation de l'invention, la solution est dérivée d'un plasma humain ou animal naturel, c'est-à-dire contenant à l'état naturel du FVIII et du FvW, humain ou animal respectivement. Un tel plasma animal peut être prélevé chez le porc, le lapin, la chèvre, cette liste n'étant pas limitative.

20 De manière surprenante, le Demandeur a constaté que les membranes filtrantes, et notamment la membrane Mustang Q®, possèdent une capacité d'adsorption du FVIII et/ou du FvW supérieure à celle d'une résine ou d'un gel. Par capacité d'adsorption, on entend la quantité des protéines cibles fixées sur le gel ; elle est généralement exprimée par le fournisseur des gels ou résines par la quantité de BSA (sérum albumine bovin) fixée sur le gel pour les résines anioniques. Par exemple, elle est comprise entre 25 à 35 mg/ml pour le gel DEAE-TOYOPEARL®, habituellement utilisé pour la purification du FVIII et/ou du FvW, alors qu'elle est supérieure ou égale à 30 mg/ml pour la membrane Mustang Q®.

25 Cette plus grande capacité d'adsorption de la membrane filtrante se traduit par la possibilité d'utiliser une plus faible quantité d'équivalent gel pour adsorber une même quantité de FVIII et/ou de FvW que sur un gel ou une résine. A titre indicatif, il est possible d'adsorber 50 à 80 UI FvW et FVIII /ml de gel sur DEAE et 200 à 250 UI VWF et FVIII/ ml d'équivalent gel pour Mustang Q®.

35 La plus grande capacité d'adsorption de la membrane filtrante par rapport à un gel ou une résine pourrait s'expliquer par une meilleure accessibilité des sites ionisés pour le FVIII et/ou le FvW, notamment lorsqu'ils forment des complexes de FVIII/FvW. En effet, ces protéines possèdent une taille élevée, notamment lorsqu'ils forment des complexes de FVIII/ FvW, et l'on peut émettre l'hypothèse que les sites ionisés leur sont plus facilement accessibles lorsque ceux-ci sont greffés sur la membrane filtrante macroporeuse, du fait de

la taille des pores, que sur les gels ou les résines, dont les sites ionisés sont enchâssés dans des canaux, les rendant moins facilement accessibles à de grosses protéines.

Avantageusement, dans ce mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé comporte les étapes suivantes :

- 5 a) Obtention du cryoprécipité du plasma,
- b) Capture, c'est-à-dire adsorption, du facteur VIII et du facteur Von Willebrand sur ladite membrane de chromatographie échangeuse d'ions, et plus particulièrement sur la membrane chromatographique échangeuse d'anions, et
- 10 c) Récupération sélective du facteur Von Willebrand et du facteur VIII par augmentations successives de la force ionique du tampon d'élution.

Avantageusement, après l'étape d'obtention du cryoprécipité du plasma, on effectue une étape de prépurification par adsorption du facteur VIII et du facteur Von Willebrand sur un gel d'alumine, puis une précipitation à froid.

A l'étape c) du procédé ci-dessus, la valeur de force ionique du tampon
15 d'élution est aisément adaptée par l'homme du métier, au vu de ses connaissances générales des propriétés physico-chimiques de chacune des protéines FvW et FVIII et des propriétés d'échanges d'ions de la membrane filtrante, qui est en général une membrane filtrante accessible dans le commerce, pour laquelle il existe des recommandations d'utilisation par le fabricant. Notamment, l'homme du métier sait, de par ses connaissances
20 générales, que le FVIII est élué d'un support de chromatographie d'échanges d'anions avec un tampon ayant une force ionique supérieure à la force ionique nécessaire à l'élution du FvW du même support.

Ainsi, à l'étape c) du procédé ci-dessus, l'homme du métier utilise un tampon de force ionique appropriée pour éluer (désorber du support) (i) le FvW, (ii) le FvW et le
25 FVIII ou bien encore (iii) successivement d'abord le FvW, puis le FVIII. Selon un premier mode de réalisation de l'alternative (iii) d'élution successive de FvW, puis de FVIII, l'homme du métier peut utiliser successivement deux tampons d'élution, chaque tampon d'élution ayant une force ionique adaptée à la désorption du FvW ou du FVIII, respectivement. Selon un second mode de réalisation de l'alternative (iii), l'homme du
30 métier réalise l'élution avec un tampon permettant de générer un gradient de force ionique croissante, avec lequel sont désorbés successivement le FvW, puis le FVIII.

Ainsi, par « augmentations successives de la force ionique du tampon d'élution », pour l'étape c) du procédé ci-dessus, on englobe une augmentation linéaire de la force ionique du tampon d'élution, qui peut être obtenue en ajoutant un sel, par exemple du
35 chlorure de sodium, du chlorure de calcium, cette liste n'étant pas limitative.

On obtient tout d'abord l'élution du FvW, puis l'élution du FVIII en augmentant la force ionique du tampon. On peut donc soit récupérer le FvW et arrêter l'élution après l'obtention du FvW, soit obtenir le FVIII en continuant l'élution.

Par « cryoprécipité » on désigne un précipité obtenu à partir d'un plasma humain ou animal par une technique de précipitation à basse température. Le cryoprécipité peut être obtenu par des méthodes bien connues de l'homme du métier. A titre d'exemple, le plasma congelé est amené à une température d'environ -5°C à -15°C puis réchauffé lentement sous agitation à une température qui ne dépasse pas 1°C ou éventuellement 4°C . Dans ces conditions, le plasma gelé fond pour donner une phase liquide et une phase solide, la phase solide, le cryoprécipité, étant alors récupérée par centrifugation. Le cryoprécipité est composé essentiellement de fibrinogène, fibronectine, facteur VIII et facteur Von Willebrand (vWF). Dans le cryoprécipité, le FVIII est généralement associé au FvW qui stabilise le FVIII.

Par « récupération sélective » on désigne la faculté de récupérer soit le FVIII, soit le FvW, soit un mélange de FVIII et de FvW, selon la méthode d'élution, selon la ou les protéines que l'on désire obtenir.

Il est possible d'obtenir soit un FvW, soit un FVIII, soit un mélange de FVIII et de FvW, en modifiant le pH, ou en augmentant la force ionique du tampon d'élution selon une technique bien connue de l'homme du métier (voir par exemple l'exemple 1).

Dans un autre mode de réalisation, la solution à purifier contient un mélange de FVIII et de FvW d'origine recombinante ou transgénique.

Ce mode de réalisation comprend les étapes suivantes :

- a) Obtention d'un surnageant cellulaire ou d'une solution pré-purifiée comprenant le FVIII et le FvW,
- b) Capture du facteur VIII et du facteur Von Willebrand sur ladite membrane de chromatographie échangeuse d'ions, et plus particulièrement sur la membrane chromatographique échangeuse d'anions, et
- c) Récupération sélective du facteur Von Willebrand et du facteur VIII par augmentations successives de la force ionique du tampon d'élution.

Dans une autre mode de réalisation de l'invention, la solution à purifier contient soit le FVIII, soit le FvW.

Ce mode de réalisation comprend les étapes suivantes :

- a) Obtention d'un surnageant cellulaire ou d'une solution purifiée comprenant le FVIII ou le FvW,
- b) Capture du facteur VIII ou du facteur Von Willebrand sur ladite membrane de chromatographie échangeuse d'ions, et plus particulièrement sur la membrane chromatographique échangeuse d'anions, et

c) Récupération du facteur Von Willebrand ou du facteur VIII.

De manière avantageuse, dans le cas d'une fraction plasmatique, le procédé de l'invention permet une réduction de la quantité des facteurs vitamine K dépendants, du fibrinogène et de la fibronectine.

5 Avantageusement, plus particulièrement lorsque la solution à purifier contient un mélange de FVIII et de FvW, la récupération sélective du FvW et du FVIII est réalisée selon les étapes suivantes :

10 c1) Elution du FvW par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie. Par exemple, la force ionique peut être augmentée par addition de chlorure de sodium à 0,25 M pour atteindre une osmolalité comprise entre 600 et 660 mOsm/Kg environ.

15 c2) Elution du FVIII par augmentation encore plus élevée de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie que pour la récupération du facteur Von Willebrand. Par exemple, la force ionique peut être augmentée par addition de chlorure de sodium à 0,7 M, ou de chlorure de calcium à 0,35 M, pour atteindre une osmolalité comprise entre 1400 et 1700 mOsm/Kg environ.

L'étape c1) est une étape de récupération sélective du FvW, au cours de laquelle on utilise une solution tampon ayant une force ionique appropriée pour désorber le FvW de la membrane filtrante échangeuse d'ions.

20 L'étape c2) est une étape de récupération sélective du FVIII, au cours de laquelle on utilise une solution tampon ayant une force ionique appropriée pour désorber le FVIII de la membrane filtrante échangeuse d'ions. A l'étape c2), on utilise une solution tampon ayant une force ionique supérieure à la force ionique de la solution tampon utilisée pour l'étape c1).

25 Ces étapes sont effectuées après l'étape de capture simultanée du FVIII et du FvW sur la membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions.

Le FvW élué à l'étape c1) est contenant très peu de FVIII. Il est récupéré et l'on obtient une solution de FvW purifiée.

30 Par ailleurs, le FVIII obtenu à l'étape c2) contient moins de FvW que la solution de départ. Il est récupéré et l'on obtient une solution de FVIII purifiée.

35 Optionnellement, il est possible de mettre en œuvre une étape supplémentaire permettant la dissociation des complexes de haut poids moléculaire FVIII-FvW, par exemple comme décrit dans le document EP 1 037 923. Optionnellement, il est alors possible de mettre en œuvre une étape de filtration supplémentaire de la solution purifiée de FVIII, sur un filtre hydrophile d'une porosité inférieure ou égale à 20nm, notamment égale à 15nm, comme décrit dans le document WO 2005/040214.

Dans un autre mode de réalisation particulier, le procédé de l'invention permet d'obtenir une solution de FvW purifié, par mise en œuvre, après l'étape d'adsorption simultanée du FVIII et du FvW sur ladite membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions, des étapes suivantes :

- 5 d) Elution du FvW par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie,
 e) capture du facteur Von Willebrand sur membrane de chromatographie échangeur d'ions, préférentiellement du même type que la première, et
10 f) élution du facteur Von Willebrand par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie.

Dans ce mode de réalisation, il est éventuellement possible, après l'étape d) d'élution du FvW par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie, d'éluer le FVIII par augmentation encore plus élevée de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie que pour la
15 récupération du facteur Von Willebrand. Ainsi, on obtient successivement, dans un procédé simplifié, à la fois une solution contenant un FvW purifié, et une autre solution contenant un FVIII purifié.

Le procédé de l'invention a donc pour avantage de permettre la purification séquentielle ou simultanée du FVIII et du FvW à partir d'une solution contenant du FVIII et
20 du FvW. Si la solution est d'origine plasmatique, le procédé de l'invention est particulièrement avantageux car il permet de rentabiliser au mieux l'utilisation du plasma, humain ou animal.

Avantageusement, ce mode de réalisation particulier comprend en plus les étapes suivantes :

- 25 g) chromatographie de la fraction éluee à l'étape c) enrichie en facteur Von Willebrand sur une colonne de gel d'affinité avec ligand gélatine, et
 h) récupération de la fraction de facteur Von Willebrand non retenue et dépourvue de fibronectine.

Le dosage de la fibronectine peut être effectué par exemple par
30 immunonéphélométrie, selon une technique bien connue de l'homme du métier.

Ainsi, un mode de réalisation du procédé de l'invention permet d'obtenir une solution de FVIII purifié et une solution de FvW purifié, en mettant en œuvre, après l'étape de capture simultanée du FVIII et du FvW sur la membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions, les étapes suivantes :

- 35 a) Elution du FvW par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie,

b) Elution du FVIII par augmentation encore plus élevée de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie que pour la récupération du facteur Von Willebrand

5 c) Capture du facteur Von Willebrand sur membrane de chromatographie échangeur d'ions,

d) élution du facteur Von Willebrand par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie.

e) Chromatographie de la fraction éluée à l'étape d) enrichie en facteur Von Willebrand sur colonne de gel d'affinité avec ligand gélatine, et

10 f) Récupération de la fraction non retenue sur le gel d'affinité et enrichie en facteur von Willebrand.

Ainsi, dans ce mode de réalisation, on obtient successivement une solution de FVIII purifié et une solution de FvW purifié.

15 Le procédé de l'invention, dans ses différents modes de réalisation, permet donc de séparer le FVIII et le FvW de manière simplifiée.

Les étapes de purification de l'invention sont les seules qui permettent de purifier séparément ou simultanément le facteur VIII et le facteur von Willebrand à partir du plasma par captures simultanées des deux protéines sur membrane de chromatographie échangeur anionique.

20 Un autre objet de l'invention est un procédé d'obtention d'un FVIII purifié comprenant la mise en œuvre du procédé de purification de l'invention.

Un autre objet de l'invention est une procédé d'obtention d'un FvW purifié comprenant la mise en œuvre du procédé de purification de l'invention.

25 D'autres aspects et avantages de l'invention seront décrits dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et ne limitent pas l'étendue de l'invention.

Figures

30 **Figure 1** : schéma du procédé de purification du facteur von Willebrand

Figure 2 : schéma du procédé de purification du facteur VIII

Exemples

35

Exemple 1 : Procédé de purification du facteur von Willebrand

Du cryoprécipité est préparé par décongélation du plasma frais congelé à une température située entre 1 °C et 6 °C.

Après centrifugation, le cryoprécipité contenant le fibrinogène, la fibronectine, le
5 facteur von Willebrand et le facteur VIII est récupéré et remis en suspension dans une solution aqueuse d'héparine sodique à 3 UI/mL. Le pH de la solution est alors ajusté à 7,0 ± 0,1.

Le cryoprécipité remis en solution est soumis à une pré purification par adsorption sur gel d'alumine pour éliminer les facteurs vitamine K dépendants et précipitation à froid
10 du fibrinogène et de la fibronectine. Ainsi, de l'hydroxyde d'alumine est ajouté à la suspension sous agitation durant 5 minutes. Le pH est ajusté à 6,5 ± 0,2 avec de l'acide acétique 0,1M et la solution est refroidie sous agitation jusqu'à ce que la température soit comprise entre 14 et 18 °C. La solution est alors centrifugée à une température de 14-18 °C. Le surnageant est récupéré et clarifié par filtration sur filtre 0,22 µm.

15 Cette solution pré purifiée est ensuite soumise à une étape d'inactivation virale par traitement solvant-détergent en présence de Polysorbate 80 (1% , p/v) et Tri-n-Butyl Phosphate (0,3% , v/v) efficace sur les virus enveloppés. Le traitement solvant-détergent est réalisé pendant une durée d'au moins 6 heures à pH 7,1.

La solution protéique traitée solvant-détergent est alors passée sur une membrane greffée d'échange d'anions forts, type capsule Mustang Q, préalablement équilibrée avec
20 une solution tampon de base, pH 6,9-7,1 additionnée de chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 370-390 mOsm/Kg.

Après passage de la solution protéique, la capsule est rincée avec la même solution tampon d'osmolalité 370-390 mOsm/Kg jusqu'à ce que la densité optique de l'effluent de
25 colonne revienne à la ligne de base. La fraction protéique non adsorbée sur la membrane est riche en fibrinogène et contient les agents chimiques ajoutés pour le traitement d'inactivation virale par traitement solvant-détergent.

Le Facteur von Willebrand adsorbé sur la membrane est alors élué par passage de la solution tampon de base, pH 6,9-7,1 de force ionique augmentée par addition de
30 chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 600-660 mOsm/Kg. La fraction éluee est alors diluée avec la solution tampon de base, pH 6,9-7,1 dépourvue de chlorure de sodium jusqu'à atteindre une osmolalité de 370-390 mOsm/Kg.

La fraction diluée est alors passée sur une membrane greffée d'échange d'anions forts, type capsule Mustang Q, préalablement équilibrée avec une solution tampon de
35 base, pH 6,9-7,1 additionnée de chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 370-390 mOsm/Kg. Après passage de la solution protéique, la capsule est rincée avec la même solution tampon d'osmolalité 370-390 mOsm/Kg jusqu'à ce que la densité optique

de l'effluent de colonne revienne à la ligne de base. Le facteur von Willebrand adsorbé sur la membrane est alors élué par passage de la solution tampon de base, pH 6,9-7,1 de force ionique augmentée par addition de chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 600-660 mOsm/Kg. La fraction éluée est ensuite chromatographiée sur gel d'affinité avec ligand gélatine préalablement équilibré avec une solution tampon de base, pH 6,9-7,1 de force ionique augmentée par addition de chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 600-660 mOsm/Kg. Après passage de la solution protéique, le gel d'affinité est rincé avec la même solution tampon d'osmolalité 600-660 mOsm/Kg jusqu'à ce que la densité optique de l'effluent de colonne revienne à la ligne de base. La fraction non adsorbée incluant le lavage du gel constitue la fraction enrichie facteur von Willebrand de haute pureté.

Le schéma de purification est présenté en figure 1

15

Résultats

Tableau 1 : Purification du facteur von Willebrand

Etape	Rendement (%)	Activité spécifique (UI/mg)
Départ cryoprécipité	100	0,46
1 ^{ère} étape de purification sur capsule Mustang Q XT5	≥ 30 (30-50)	20-30
2 ^{ème} étape de purification sur capsule Mustang Q XT5 + chromatographie sur gelatin-Sepharose	≥ 70	> 80

20

Exemple 2 : Procédé de purification du facteur VIII

Du cryoprécipité est préparé par décongélation du plasma frais congelé à une température située entre 1 °C et 6 °C.

Après centrifugation, le cryoprécipité contenant le fibrinogène, la fibronectine, le facteur von Willebrand et le facteur VIII est récupéré et remis en suspension dans une solution aqueuse d'héparine sodique à 3 UI/mL. Le pH de la solution est alors ajusté à 7,0 ± 0,1.

Le cryoprécipité remis en solution est soumis à une pré purification par adsorption sur gel d'alumine pour éliminer les facteurs vitamine K dépendants et précipitation à froid du fibrinogène et de la fibronectine. Ainsi, de l'hydroxyde d'alumine est ajouté à la

suspension sous agitation durant 5 minutes. Le pH est ajusté à $6,5 \pm 0,2$ avec de l'acide acétique 0,1M et la solution est refroidie sous agitation jusqu'à ce que la température soit comprise entre 14 et 18°C. La solution est alors centrifugée à une température de 14-18°C. Le surnageant est récupéré et clarifié par filtration sur filtre 0,22 µm.

5 Cette solution pré purifiée est ensuite soumise à une étape d'inactivation virale par traitement solvant-détergent en présence de Polysorbate 80 (1% , p/v) et Tri-n-Butyl Phosphate (0,3% , v/v) efficace sur les virus enveloppés. Le traitement solvant-détergent est réalisé pendant une durée d'au moins 6 heures à pH 7,1.

10 La solution protéique traitée solvant-détergent est alors passée sur une membrane greffée d'échange d'anions forts, type capsule Mustang Q, préalablement équilibrée avec une solution tampon de base, pH 6,9-7,1 additionnée de chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 370-390 mOsm/Kg.

15 Après passage de la solution protéique, la capsule est rincée avec la même solution tampon d'osmolalité 370-390 mOsm/Kg jusqu'à ce que la densité optique de l'effluent de colonne revienne à la ligne de base. La fraction protéique non adsorbée sur la membrane est riche en fibrinogène et contient les agents chimiques ajoutés pour le traitement d'inactivation virale par traitement solvant-détergent.

20 Le Facteur von Willebrand adsorbé sur la membrane est alors élué par passage de la solution tampon de base, pH 6,9-7,1 de force ionique augmentée par addition de chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 600-660 mOsm/Kg. La purification du facteur von Willebrand peut être poursuivie comme décrit dans l'exemple 1. Le Facteur VIII adsorbé sur la membrane est ensuite élué par passage de la solution tampon de base, pH 6,9-7,1 de force ionique augmentée par addition de chlorure de sodium pour atteindre une osmolalité de 1400-1700 mOsm/Kg. Avantagusement, le facteur VIII est élué par une
25 solution tampon, pH 6,0, de force ionique élevée obtenue par addition de chlorure de calcium.

Le schéma de purification est présenté en figure 2.

30 Résultats

Tableau 2 : Purification du facteur VIII

Etape	Rendement (%)	Activité spécifique (UI/mg)
Départ cryoprécipité	100	0,38
Etape de purification sur capsule Mustang Q XT5	≥ 45 (40-60)	≥ 110

Revendications

1. Procédé de purification de FVIII ou de FvW à partir d'une solution choisie parmi (i) une solution contenant un mélange de FVIII et de FvW, (ii) une solution contenant du FvW, (iii) une solution issue d'une sécrétion d'un animal non-humain et (iv) une solution issue d'un extrait végétal contenant du FVIII, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'adsorption du FVIII ou du FvW sur une membrane filtrante de chromatographie échangeuse d'ions.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite membrane filtrante est une membrane de chromatographie échangeuse d'anions.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite membrane filtrante est un échangeur anionique fort.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite membrane possède un revêtement comprenant des groupements amines quaternaires.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite membrane est de type macroporeux.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite membrane est en polyéthersulfone.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite solution contient un mélange de FVIII et de FvW.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite solution est d'origine plasmatique.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) Obtention du cryoprécipité du plasma,
 - b) Adsorption du facteur VIII et du facteur Von Willebrand sur ladite membrane de chromatographie échangeuse d'ions,
 - c) Récupération du facteur VIII ou du facteur Von Willebrand en utilisant un tampon d'élution de force ionique appropriée.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite récupération sélective du facteur Von Willebrand et du facteur VIII est réalisée selon les étapes suivantes :
- c1) Récupération sélective du FvW par élution avec un tampon de force ionique appropriée,
 - c2) Récupération sélective du FVIII par élution avec un tampon approprié ayant une force ionique supérieure à la force ionique du tampon utilisé à l'étape c1)..

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes ultérieures suivantes :

d) Elution du FvW par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie,

5 e) Capture du facteur Von Willebrand sur membrane de chromatographie échangeur d'ions, préférentiellement du même type que la première,

f) Elution du facteur Von Willebrand par augmentation de la force ionique du tampon d'équilibrage de ladite membrane de chromatographie.

10 12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes :

g) Chromatographie de la fraction éluée à l'étape c) de la revendication 11 enrichie en facteur Von Willebrand sur colonne de gel d'affinité avec ligand gélatine,

h) Récupération de la fraction de facteur Von Willebrand non retenue et dépourvue de fibronectine.

15 13. Procédé d'obtention d'un FVIII purifié, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre du procédé tel que définit dans l'une quelconque des revendications 1 à 10.

14. Procédé d'obtention d'un FvW purifié, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en œuvre du procédé tel que définit dans l'une quelconque des revendications 1 à 12.

1/3

Figure 1

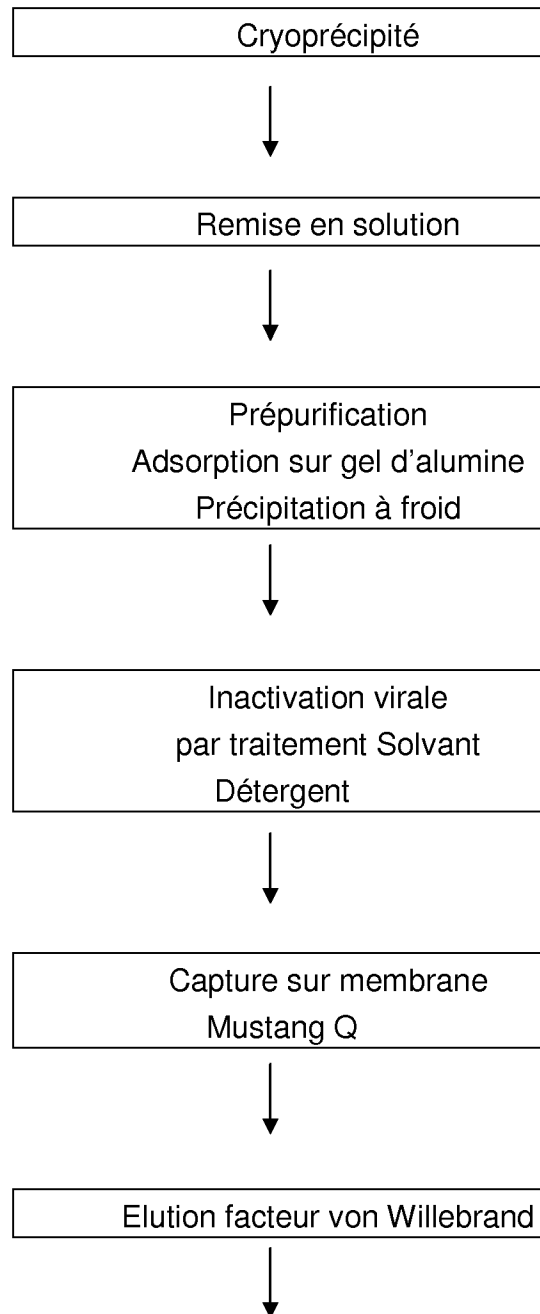
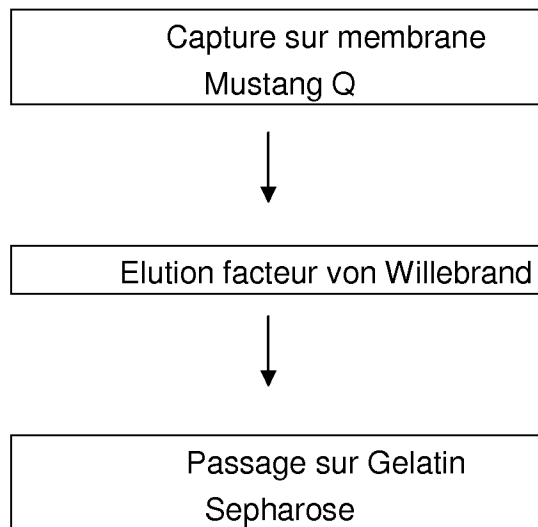


Figure 1 (suite)



3/3

Figure 2

