

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication :

3 076 294

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

17 63368

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 K 1/30** (2018.01), A 61 K 39/395, C 07 K 1/36,
C 07 K 16/00

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 PROCÉDE DE PURIFICATION D'ANTICORPS A PARTIR DE LAIT BRUT.

②2 Date de dépôt : 29.12.17.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 05.07.19 Bulletin 19/27.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 28.01.22 Bulletin 22/04.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : PAOLANTONACCI PHILIPPE,
CLAUDEL BEATRICE et CHTOUROU ABDESSATAR.

⑦3 Titulaire(s) : LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
Société anonyme.

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

FR 3 076 294 - B1



DOMAINE DE L'INVENTION

5 La présente invention se situe dans le domaine des procédés de purification de compositions comprenant un anticorps produit dans le lait d'un mammifère non humain. Elle concerne un procédé de préparation d'une composition comprenant un anticorps à partir de lait brut d'un mammifère non humain exprimant ledit anticorps dans son lait, comprenant a) une étape de précipitation du lait brut à l'acide caprylique, b) une étape de séparation consistant en une
10 centrifugation ou une filtration à travers un filtre en profondeur, et optionnellement c) une étape de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif.

ART ANTERIEUR

Les anticorps sont utilisés dans un grand nombre d'applications industrielles et pharmaceutiques, tels que le diagnostic et la thérapie. Afin d'obtenir des quantités
15 suffisantes de façon régulière, les anticorps sont généralement produits de manière recombinante par des systèmes d'expression, tels que des organismes unicellulaires (bactéries ou levures), des cellules d'insecte (système baculovirus/cellule d'insecte) ou encore des plantes transgéniques. Néanmoins, ces systèmes d'expression présentent de nombreuses limitations, en particulier en lien avec un repliement protéique imparfait, l'impossibilité de
20 produire des protéines complexes tels que les anticorps ou encore une glycosylation incomplète ou différente de celle retrouvée chez l'homme.

Compte tenu de ces limitations, les systèmes d'expression les plus utilisés pour la production d'anticorps, en particulier pour des applications pharmaceutiques, sont, à l'heure actuelle, les cellules de mammifère. À titre d'exemple, le principe actif de MabThera® (rituximab), un
25 anticorps chimérique anti-CD20 pour le traitement du lymphome non-hodgkinien, est produit de manière recombinante dans la lignée cellulaire CHO (Chinese Ovary Hamster). Ce système permet la production d'anticorps avec des motifs de glycosylation très proches de celles des protéines endogènes humaines mais offrent généralement des rendements de production faibles. De plus, ce système impose aux fabricants des coûts significatifs de production.

30 Afin produire des anticorps avec un haut rendement et à moindre coût que ceux obtenus à partir des lignées cellulaires, l'expression d'anticorps dans le lait de mammifères non-humains transgéniques, tels que les vaches, les lapines ou les chèvres, a été développée. En

effet, il a été estimé que le coût brut de production d'une protéine recombinante dans le lait transgénique est 5 à 100-fois inférieur au coût de sa production dans la lignée cellulaire CHO. Dans cette approche, l'expression de l'anticorps est dirigée au niveau des cellules épithéliales mammaires. L'anticorps est ainsi sécrété dans le lait et peut être récupéré à partir de ce
 5 fluide par des procédés d'extraction et de purification. À titre d'exemple, on peut notamment citer les travaux de Wei et al-2011, décrivant l'expression de l'anticorps chimérique chHabl8 dans le lait de souris transgéniques.

Bien que la production d'anticorps dans le lait de mammifères non humains permette d'obtenir un niveau d'expression très satisfaisant, l'extraction et la purification des anticorps à
 10 partir du lait demeure une des étapes limitantes de ce système d'expression.

En effet, le lait est un fluide biologique très complexe, constitué d'environ 10% en poids de matière sèche et d'environ 90% en poids d'eau et comprenant divers constituants que l'on peut regrouper en trois catégories. La première catégorie, appelée lactosérum (ou petit lait), est constituée de glucides, de protéines solubles, telles que les lactalbumines et les
 15 lactoglobulines, ainsi que les albumines et les immunoglobulines provenant du sang, de minéraux et de vitamines hydrosolubles. La deuxième catégorie, appelée phase lipidique (ou crème), est constituée essentiellement de lipides sous forme d'émulsion de globules gras d'environ 2 à 12 μm de diamètre. La troisième catégorie, dénommée phase micellaire colloïdale, est constituée essentiellement des protéines de caséine et de sels
 20 phosphocalciques, qui forment des complexes micellaires colloïdaux, pouvant atteindre des diamètres d'environ 0,5 μm , et se présente notamment sous la forme d'agrégats (« *clusters* ») de phosphate tricalcique.

Le lait n'ayant subi aucune étape de séparation préalable de l'un de ses constituants est appelé « lait brut ». Il comprend l'ensemble des constituants normaux du lait, en particulier
 25 le lait brut comprend les lipides et toutes les protéines, qu'elles soient présentes dans le lactosérum ou dans la phase micellaire colloïdale (le lait brut comprend notamment les caséines et les β -lactoglobulines).

Les différents constituants du lait peuvent être séparés selon plusieurs méthodes :

-L'écémage, par centrifugation en général, permet de séparer le « lait écrémé »
 30 (comprenant le lactosérum- également appelé « petit lait » - et les caséines) de la crème (autrement dit la phase lipidique). Après élimination de la crème (phase lipidique), on obtient ainsi un « lait brut dégraissé » ou « lait écrémé », qui comprend toutes les protéines, qu'elles soient présentes dans le lactosérum ou dans la phase micellaire colloïdale (le lait brut comprend notamment les caséines et les β -lactoglobulines).

- La clarification permet de séparer le lactosérum des phases micellaires (essentiellement des protéines de caséine et des sels phosphocalciques) et lipidiques (ou crème). Selon la méthode utilisée, la clarification peut également éliminer certaines protéines du lactosérum par précipitation, par exemple par précipitation à l'aide de citrate. Le « lait clarifié » (appelé également 'lactosérum' ou 'petit lait') est ainsi un lait limpide qui a perdu ses lipides (crème) et qui a déjà perdu une partie de ses protéines (notamment les caséines, et parfois, selon la méthode, certaines protéines du lactosérum).

- L'acidification, par exemple par ajout de ferments lactiques ou d'un acide tel que l'acide acétique, permet de précipiter les caséines présentes dans le lait et d'obtenir ainsi le lactosérum à partir de lait écrémé.

La richesse et la complexité de chaque catégorie de constituants du lait rend d'autant plus difficile la mise en œuvre d'un procédé de purification d'un anticorps.

Plusieurs demandes et brevets décrivent des procédés de purification d'anticorps à partir du lait. Par exemple, la demande PCT WO 97/12901 décrit la purification d'anticorps polyclonaux d'animaux hyperimmunisés à partir du lactosérum (obtenu après clarification du lait brut). La demande PCT WO 2008/099077 décrit un procédé de purification de protéines recombinantes, dont des anticorps, comprenant des étapes d'écémage et de délipidation, de purification, d'éluion et d'élimination des protéines de lait. La demande PCT WO 2016/156752 décrit un procédé de purification comprenant une étape de clarification à l'aide d'un sel de poly(diallyldiméthylammonium) suivi par des étapes de chromatographie d'affinité et d'inactivation/élimination d'agents pathogènes, alors que la demande PCT WO 2016/034726 décrit un procédé de purification comprenant des étapes de chromatographie d'affinité, d'inactivation virale, de chromatographie échangeuse de cations, de chromatographie échangeuse d'anions, et, enfin, de nanofiltration. On constate que les étapes de purification d'anticorps à partir du lait sont généralement nombreuses, et que les procédés de l'art antérieur nécessitent de manière générale une première étape d'« écémage », dans laquelle la matière grasse est séparée du lait, donnant ainsi deux fractions : le lait écrémé (comprenant le lactosérum et les caséines) et la crème. De plus, plusieurs étapes en aval sont généralement nécessaires afin d'obtenir une composition comprenant un anticorps ayant un niveau de qualité, de pureté, et de sécurité sanitaire considéré comme étant acceptable (e.g. étapes de filtration, de chromatographie, d'inactivation virale, etc.). Ces critères sont particulièrement importants lorsqu'une composition comprenant un anticorps est destinée à une application pharmaceutique. Enfin, s'il est possible de précipiter les caséines présentes dans le lait par une simple étape d'acidification (phénomène permettant d'obtenir le lactosérum), ce type de précipitation

(sans acide caprylique) est insuffisant car certaines protéines, telle que la β -lactoglobuline, subsistent dans la fraction soluble.

Il existe des demandes et des brevets décrivant des procédés de purification d'anticorps comprenant une étape de précipitation à l'acide caprylique, telles que les demandes PCT WO 2006/064373, WO 2010/151632, et WO 2014/123485. Cependant, ces demandes concernent d'autres matières premières que le lait, telles que du sérum, un milieu de culture cellulaire, ou des lysats cellulaires, et comprend à chaque fois au moins une première étape de pré-purification avant l'étape de précipitation par l'acide caprylique. À titre d'exemple, le plasma subit une première étape de cryoprécipitation, afin de récupérer uniquement le cryosurnageant, qui peut être en plus traité à l'éthanol, avant ajout de l'acide caprylique.

Il existe donc, à l'heure actuelle, un besoin pour de nouveaux procédés de purification d'anticorps à partir de lait. En particulier, il existe un besoin pour de nouveaux procédés plus simples et plus rapides, notamment comprenant moins d'étapes. Il existe également un besoin pour de nouveaux procédés permettant de diminuer le coût de purification, de préférence sans impact sur le rendement et/ou sur la qualité de l'anticorps purifié. Enfin, il existe un besoin pour de nouveaux procédés à partir desquels une composition comprenant un anticorps peut être directement utilisée, notamment en tant que produit pharmaceutique.

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une composition comprenant un anticorps à partir de lait brut d'un mammifère non-humain comprenant une étape de précipitation du lait brut à l'acide caprylique.

En effet, dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont mis en évidence qu'un procédé de préparation d'une composition comprenant un anticorps à partir de lait brut d'un mammifère non-humain qui comprend une première étape de précipitation du lait brut à l'acide caprylique permet, à la fois, de clarifier, de purifier, et de sécuriser ladite composition, et ce malgré la complexité de la matière première que constitue le lait brut. Le procédé de l'invention est avantageux car très facile à mettre en œuvre, puisqu'il ne comporte que peu d'étapes d'une part, et d'autre part qu'il ne nécessite pas la mise en œuvre d'une étape d'écémage du lait avant l'étape de précipitation à l'acide caprylique. De plus, il permet une très bonne élimination des protéines non-désirées, telle que la β -lactoglobuline. En effet, la quantité résiduelle de cette protéine observée est plus faible avec le procédé selon l'invention que lorsqu'une simple étape d'acidification à l'acide acétique est utilisée. Ce procédé est également avantageux car il permet de réduire le temps nécessaire pour

purifier un anticorps, sans toutefois diminuer la qualité ou la quantité obtenue de composition comprenant l'anticorps. Le coût de la purification est avantageusement réduit, et la rentabilité ainsi améliorée. Le procédé de l'invention permet également d'obtenir une composition comprenant un anticorps approprié pour une utilisation en tant que produit pharmaceutique. À titre d'exemple, la composition comprenant un anticorps purifié par le procédé de l'invention peut être administré à un sujet, par exemple, par voie orale, sans subir d'étapes supplémentaires de purification ou de filtration/inactivation virale,

Dans un premier aspect, la présente invention concerne donc un procédé de préparation d'une composition comprenant un anticorps, avantageusement un anticorps monoclonal, à partir de lait brut d'un mammifère non humain exprimant ledit anticorps dans son lait, comprenant :

- a) une étape de précipitation du lait brut à l'acide caprylique,
- b) une étape de séparation consistant en une centrifugation ou une filtration à travers un filtre en profondeur, et optionnellement
- c) une étape de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif.

Avantageusement, l'étape a) permet à la fois de clarifier le lait et de le sécuriser sur le plan biologique et de purifier l'anticorps (i.e. d'augmenter sa proportion sur matière sèche dans la solution obtenue à l'issue de l'étape a) par rapport à sa proportion sur matière sèche dans le lait brut).

Avantageusement, l'étape a) précipite les β -lactoglobulines.

Avantageusement, le lait brut n'a subi aucune étape préalable de clarification et/ou d'écémage et/ou d'acidification.

Les étapes de séparation (étape b)) et de filtration (étape c)) dudit procédé permettent respectivement d'enlever les protéines précipitées par l'acide caprylique et les lipides, et d'éliminer l'acide caprylique lui-même.

Avantageusement, la concentration en protéines totales du lait brut avant l'étape de précipitation à l'acide caprylique est comprise entre 25 et 100 g/l, de façon préférée entre 30 et 60 g/l. Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, la concentration en protéines totales du lait brut avant l'étape a) de précipitation à l'acide caprylique est égale à 50g/l.

Avantageusement, la concentration en anticorps du lait brut avant l'étape a) de précipitation à l'acide caprylique est comprise entre 3 et 50 g/l, plus avantageusement entre 5 et 30 g/l.

Selon un mode de réalisation encore plus avantageux, la concentration en anticorps du lait brut avant l'étape de précipitation à l'acide caprylique est égale à 20 g/l.

5 Dans certains modes de réalisation, préalablement à l'étape a) de précipitation à l'acide caprylique, le lait brut n'est pas dilué ou est dilué, à un ratio (lait brut/diluant, exprimés en volumes) allant de 1/0,1 à 1/4. De façon préférée, pour générer la solution avant précipitation, le lait brut est dilué à un ratio (lait brut/diluant, exprimé en volumes) égal à 1/3.

10 Avantageusement, le pourcentage final (masse/masse) d'acide caprylique dans le lait brut (masse d'acide caprylique / masse de lait brut x 100) mis en œuvre à l'étape de précipitation est compris entre 0,5 et 3,0 %, de façon plus avantageuse entre 1,0 et 2,5 %. De façon encore plus avantageuse, le pourcentage (masse/masse) d'acide caprylique mis en œuvre à l'étape de précipitation est compris entre 1,3 et 2,0 % et notamment de 1,7 % ou environ 1,7 % (1,7 ± 0,1 %).

15 Avantageusement, après addition de l'acide caprylique au lait brut à l'étape a) de précipitation, le pH du mélange est ajusté à une valeur inférieure à 4,8. De façon plus avantageuse, le pH du mélange est ajusté à une valeur comprise entre 4,0 et 4,8, de façon encore plus avantageuse à une valeur de 4,3. L'ajustement du pH peut être réalisé en utilisant n'importe quel acide approprié, notamment choisi parmi l'acide acétique et l'acide citrique. Dans certains modes de réalisation du procédé selon l'invention, le pH est ajusté par
20 ajout d'acide acétique.

Avantageusement, l'étape b) de séparation est réalisée par le biais d'une étape de filtration en profondeur, qui est de préférence effectuée à l'aide d'un filtre à base de fibres de cellulose. Dans un mode de réalisation particulier, le seuil de coupure dudit filtre est compris entre 10 et 80 µm, de préférence entre 20 et 50 µm. Avantageusement, le filtre est un filtre
25 en profondeur de 4 à 5 mm d'épaisseur, composé de fibres de cellulose et de perlite, avec un seuil de coupure entre 10 et 50 µm, de type Seitz® T3500. Dans un mode de réalisation avantageux, l'étape de séparation par le biais d'une étape de filtration en profondeur est effectuée en présence d'un adjuvant de filtration (utilisé en alluvionnage ou en précouche), qui peut être minéral (par exemple la terre de diatomée ou la perlite) ou organique (tel que
30 la cellulose).

Le procédé selon l'invention peut en outre comprendre au moins une étape supplémentaire, et postérieure à l'étape b) de centrifugation ou de filtration à travers un filtre en profondeur

(lorsque l'étape c) n'est pas mise en œuvre) ou à l'étape c) de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif (lorsque celle-ci est mise en œuvre), choisie parmi les étapes de :

- Concentration, avantageusement par ultrafiltration et/ou diafiltration,
- 5 • Purification, avantageusement par chromatographie, notamment par chromatographie échangeuse d'ions ou d'affinité, avantageusement de chromatographie sur résine échangeuse de cations, de chromatographie sur résine échangeuse d'anions, ou de chromatographie d'affinité, avantageusement de chromatographie d'affinité utilisant des ligands aptamères,
- Formulation, et/ou
- 10 • Sécurisation biologique, avantageusement par l'élimination et/ou l'inactivation des pathogènes résiduels, notamment une inactivation virale et/ou une élimination virale.

Avantageusement, l'anticorps est un anticorps d'isotype choisi parmi IgG et IgA, de manière préférée d'isotype IgG. Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps purifié d'isotype IgG a conservé une répartition des sous-classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 similaire à celle du
15 lait brut non purifié.

Avantageusement, le mammifère non humain exprimant un anticorps dans son lait est la lapine, la vache ou la chèvre.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1. Schéma illustrant le procédé selon l'invention.

20 DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

Comme indiqué précédemment, dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont mis en évidence un nouveau procédé de préparation d'une composition comprenant un anticorps à partir de lait brut d'un mammifère non humain exprimant ledit anticorps dans son lait et comprenant une étape de précipitation du lait brut à l'acide caprylique. En effet, les
25 inventeurs ont démontré que de façon surprenante, l'étape de précipitation à l'acide caprylique permet à la fois de clarifier, de purifier, et de sécuriser un anticorps purifié à partir du lait brut par le biais de cette seule étape. Ainsi, ledit procédé comprenant une étape de précipitation à l'acide caprylique est appelé ici un procédé « trois-en-un », car remplissant trois fonctions qui ont jusqu'ici été effectuées par des étapes individuelles. Les
30 inventeurs ont notamment démontré que l'étape de précipitation à l'acide caprylique du lait brut permet de clarifier le lait, purifiant l'anticorps présent dans le lait en précipitant les

autres protéines, dont les protéines de la famille des caséines (mais aussi la β -lactoglobuline, la lactoferrine, la sérum albumine, l' α -lactalbumine), et améliorant la sécurité du produit par l'inactivation et l'élimination des virus d'au moins 4 logs décimaux. De façon particulièrement avantageuse, les inventeurs ont démontré que l'étape de précipitation à l'acide caprylique permet de précipiter la β -lactoglobuline.

PROCEDE DE PREPARATION

Un premier aspect de l'invention concerne donc un procédé de préparation d'une composition comprenant un anticorps à partir de lait brut d'un mammifère non humain exprimant ledit anticorps dans son lait comprenant :

- 10 a) une étape de précipitation du lait brut à l'acide caprylique,
- b) une étape de séparation consistant en une centrifugation ou une filtration à travers un filtre en profondeur, et optionnellement
- c) une étape de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif.

15 Avantageusement, l'étape a) permet à la fois de clarifier le lait et de le sécuriser sur le plan biologique et de purifier l'anticorps (i.e. d'augmenter sa proportion sur matière sèche dans la solution obtenue à l'issue de l'étape a) par rapport à sa proportion sur matière sèche dans le lait brut).

Les étapes a) à c) sont mises en œuvre dans l'ordre a), puis b), puis optionnellement c). Dans certain cas (voir ci-dessous), des étapes supplémentaires peuvent s'intercaler :

- 20 • Avant l'étape a) (à l'exclusion de toute étape de séparation préalable de l'un des constituants du lait brut telle que la clarification, l'écémage ou l'acidification).
Par exemple, l'étape a) peut être précédée d'une étape de congélation puis de décongélation du lait brut, et/ou par une étape de dilution du lait brut, avantageusement dans de l'eau.
- 25 • Entre les étapes a) et b).
Par exemple, une étape d'incubation peut être ajoutée entre les étapes a) et b).
- Entre les étapes b) et c).
Par exemple, une étape d'incubation peut être ajoutée entre les étapes b) et c).
- 30 • Après l'étape b) de centrifugation ou de filtration à travers un filtre en profondeur (lorsque l'étape c) n'est pas mise en œuvre) ou l'étape c) de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif (lorsque l'étape c) est mise en œuvre).

Par exemple, des étapes de purification, de concentration, de formulation, et/ou de sécurisation biologique de la composition peuvent être ajoutées après l'étape b) ou l'étape c).

Ces différentes étapes supplémentaires sont détaillées ci-dessous.

- 5 Le procédé de purification selon l'invention est avantageusement mis en œuvre à partir du lait brut d'un mammifère non-humain, avantageusement un mammifère non-humain transgénique, comprenant l'anticorps sous forme non purifiée, c'est à dire comprenant en outre d'autres produits contaminants (autres protéines, ADN, sucres, lipides, etc...).

Lait

- 10 Par « lait » on entend, au sens de la présente invention, un lait obtenu à partir d'un mammifère non humain transgénique ou non-transgénique (on parlera alors de mammifère non humain naturel). Par « lait transgénique » on entend un lait obtenu à partir d'un mammifère non humain transgénique, c'est-à-dire à partir d'un mammifère non-humain qui a été génétiquement modifié de manière à ce qu'il produise un anticorps recombinant d'intérêt
15 dans son lait. Par « lait naturel » ou « lait non-transgénique », on entend un lait obtenu à partir d'un mammifère non humain non transgénique.

Un mammifère non humain naturel (i.e. non transgénique) peut notamment être hyperimmunisé afin d'augmenter la quantité d'un anticorps polyclonal dirigé contre un antigène particulier présente dans son lait.

- 20 Un mammifère non humain transgénique peut être obtenu par injection directe du ou des gène(s) d'intérêt (ici, les gènes réarrangés codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps) dans un œuf fertilisé (Gordon et al-1980). Un mammifère non-humain transgénique peut également être obtenu par introduction du ou des gène(s) d'intérêt (ici, les gènes réarrangés codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps) dans une cellule
25 souche embryonnaire et préparation du mammifère par une méthode d'agrégation de chimère ou une méthode d'injection de chimère (voir *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); *Gene Targeting, A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press (1993)). Un mammifère non humain transgénique peut également être obtenu par une technique de clonage dans laquelle un
30 noyau, dans lequel le ou les gène(s) d'intérêt (ici, les gènes réarrangés codant pour les chaînes lourde et légère de l'anticorps) a été introduit, est transplanté dans un œuf énucléé (Ryan et al-1997 ; Cibelli et al-1998 ; WO0026357A2). Un mammifère non humain transgénique produisant un anticorps d'intérêt peut être préparé par les méthodes ci-dessus.

L'anticorps peut alors être accumulé dans le mammifère non humain transgénique et récolté, notamment à partir du lait du mammifère. Pour la production de protéines, notamment d'anticorps, dans le lait des mammifères non humains transgéniques, des procédés de préparation sont notamment décrits dans WO9004036A1, WO9517085A1, WO0126455A1, 5 WO2004050847A2, WO2005033281A2, WO2007048077A2. Dans au moins certains de ces procédés, la séquence codant l'anticorps est liée de manière fonctionnelle à une séquence de contrôle qui permet à la séquence codante d'être exprimée dans le lait d'un mammifère non humain transgénique. La séquence codante peut être liée de manière fonctionnelle à une séquence de contrôle qui permet à la séquence codante d'être exprimée dans le lait d'un 10 mammifère non humain transgénique. Une séquence d'ADN qui est appropriée pour diriger la production dans le lait d'animaux transgéniques peut porter une région promotrice 5' dérivée d'une protéine naturellement présente dans le lait. Un tel promoteur est par conséquent sous le contrôle de facteurs hormonaux et tissulaires et est particulièrement actif dans le tissu mammaire en lactation. Le promoteur peut en outre être lié de manière fonctionnelle à une séquence d'ADN dirigeant la production d'une séquence signal qui dirige la sécrétion de la protéine transgénique à travers l'épithélium mammaire dans le lait. Dans certains modes de réalisation, une séquence en 3', qui peut être dérivée d'une protéine naturellement présente dans le lait, peut être ajoutée pour améliorer la stabilité de l'ARNm. Telle qu'utilisée ici, une "séquence signal" est une séquence d'acide nucléique qui code un signal de sécrétion de 20 protéine et qui, lorsqu'elle est liée de manière fonctionnelle en aval d'une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine transgénique, dirige sa sécrétion. La séquence signal peut être une séquence signal humaine native, une séquence signal artificielle, ou peut être obtenue à partir du même gène que le promoteur utilisé pour diriger la transcription de la séquence codante de l'anticorps, ou d'une autre protéine normalement sécrétée à partir d'une cellule épithéliale mammaire mammalienne. Dans certains modes de réalisation, les promoteurs peuvent être des promoteurs spécifiques du lait. Tel qu'utilisé ici, un "promoteur spécifique du lait" est un promoteur qui dirige naturellement l'expression d'un gène dans une cellule qui sécrète une protéine dans le lait (par exemple, une cellule épithéliale mammaire), ce qui comprend, par exemple, les promoteurs de caséine (par exemple alpha, notamment 30 alpha S1 ou alpha S2 ; bêta, gamma, ou kappa), le promoteur de la protéine acide de lactosérum (WAP), le promoteur de la beta-lactoglobuline, et le promoteur de l'alpha-lactalbumine. Sont également inclus dans cette définition les promoteurs qui sont spécifiquement activés dans le tissu mammaire, comme par exemple le promoteur de longue répétition terminale (LTR) du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV).

35 Les mammifères non humains d'intérêt particuliers incluent notamment la chèvre, la brebis, les bovins (notamment la vache), le chameau, le lama, la souris, le rat, et la lapine. Selon un

mode préférentiel de l'invention, le mammifère non humain exprimant un anticorps dans son lait est un bovin, de façon préférée la vache, ou la chèvre ou la lapine.

Par « lait brut » on entend plus particulièrement un lait n'ayant pas subi d'étape de séparation préalable de l'un de ses constituants ni d'étape de purification visant à augmenter la proportion relative de l'anticorps par rapport aux autres constituants du lait. Notamment, au sens de l'invention, du « lait brut » n'a pas subi d'étape d'écémage et/ou de clarification et/ou de délipidation et/ou d'acidification avant l'étape de précipitation à l'acide caprylique. Avantageusement, le lait brut est donc un lait non-clarifié comprenant l'ensemble des constituants initialement présents dans ledit lait (lipides, protéines, glucides, minéraux, vitamines...). En particulier, le lait brut comprend les lipides et toutes les protéines (notamment les caséines et les β -lactoglobulines). Le « lait brut » au sens de l'invention comprend un lait ayant subi éventuellement une ou plusieurs étapes de traitement autres que des étapes de séparation préalable de l'un de ses constituants ou de purification. Ainsi, le « lait brut » au sens de l'invention comprend un lait ayant subi éventuellement une congélation/ décongélation, par exemple en cas de stockage du lait au préalable, avant l'étape de précipitation à l'acide caprylique. Le « lait brut » au sens de l'invention comprend également un lait ayant subi éventuellement une dilution. En effet, de telles étapes ne sont pas des étapes de de séparation préalable de l'un de ses constituants ne de purification ni. Avantageusement, le lait brut n'a pas subi d'autre traitement qu'une congélation/décongélation et/ou une dilution avant l'étape a) de précipitation à l'acide caprylique.

Le terme « lait brut » comprend le « lait brut transgénique », issu des mammifères non humains transgéniques, et le « lait brut naturel », issu des mammifères non humains non transgéniques ; de manière préférée, le lait brut est du lait brut transgénique.

Par « écémage » du lait, on entend désigner une étape d'élimination des lipides (également appelés « crème »), ce qui conduit à un « lait écémé » (également appelé « lait dégraissé ») comprenant le lactosérum (ou « petit lait ») et la phase colloïdale (comprenant les caséines). Le « lait écémé » ou « lait dégraissé » comprend donc le lactosérum (ou « petit lait ») et toutes les protéines, qu'elles soient présentes dans le lactosérum ou dans la phase micellaire colloïdale, et notamment les caséines et les protéines du lactosérum, ainsi que les éventuelles protéines d'intérêt, telles que les anticorps.

Par « clarification du lait » on entend désigner une étape qui permet de séparer le lactosérum des phases micellaires et lipidiques. La clarification peut être réalisée de différentes manières, et notamment par centrifugation, par filtration, ou par acidification. Selon la

méthode utilisée, la clarification peut également éliminer certaines protéines du lactosérum par précipitation, par exemple par précipitation à l'aide de citrate. Le « lait clarifié » ou « lactosérum » ou « petit lait » est ainsi un lait limpide qui a déjà perdu ses lipides (crème) et qui a perdu une partie de ses protéines (notamment les caséines, et parfois, selon la méthode, certaines protéines du lactosérum).

Par « acidification du lait » on entend désigner une étape qui permet de précipiter les caséines présentes dans le lait et d'obtenir ainsi le lactosérum à partir de lait écrémé, par exemple par ajout de ferments lactiques ou d'un acide tel que l'acide acétique.

Par « petit lait » ou « lactosérum » ou « lait clarifié » on entend un lait ayant subi une ou plusieurs étapes conduisant à l'élimination des lipides et des caséines, par exemple une étape de clarification par précipitation acide des caséines.

Avantageusement, la concentration en protéines totales du lait brut avant l'étape a) de précipitation par l'acide caprylique est comprise entre 25 et 100 g/L. De manière avantageuse, le lait brut présente une concentration en protéines totales entre 25 et 90 g/L, entre 25 et 80 g/L, entre 25 et 75 g/L, entre 25 et 70 g/L, entre 25 et 60 g/L, entre 25 et 50 g/L, de manière plus avantageuse entre 30 et 90 g/L, entre 30 et 80 g/L, entre 30 et 70 g/L, entre 30 et 60 g/L, entre 30 et 50 g/L, de manière plus avantageuse entre 40 et 90 g/L, entre 40 et 80 g/L, entre 40 et 70 g/L, entre 40 et 60 g/L, entre 40 et 55 g/L, et en particulier entre 45 et 55 g/L. De manière encore plus avantageuse, le lait brut présente une concentration en protéines totales égale à 50 g/L. La concentration en protéines totales du lait brut peut être déterminée par l'homme de métier au vu de ses connaissances générales. À titre d'exemples non-limitants, la concentration en protéines totales peut être déterminée par les techniques de dosage des protéines totales telles que la technique du Biuret, du BCA (dosage protéique par l'acide bicinchoninique), du Bradford, du Bleu de Coomassie, de la détermination de l'azote organique selon Kjeldahl, de l'absorption en UV ou en IR, de préférence par la méthode BCA.

Les « protéines totales » représentent l'ensemble des protéines de la composition et comprennent l'anticorps à purifier ainsi que les protéines contaminantes, en particulier les caséines et les protéines du lactosérum telles que la β -lactoglobuline.

Comme indiqué ci-dessus, le « lait brut » au sens de l'invention comprend un lait brut ayant subi éventuellement une étape de dilution avant l'étape de précipitation à l'acide caprylique. Selon un premier mode de réalisation, le lait brut n'est pas dilué. Selon un deuxième mode de réalisation, et notamment lorsque la concentration en protéines totales et/ou la concentration en anticorps est trop élevée, le lait brut est dilué dans un diluant tel que l'eau

ou une solution tampon. De préférence, le diluant est de l'eau purifiée. De manière avantageuse, le rapport en volume de lait brut sur diluant (lait brut/diluant) est compris entre 1/0,1 et 1/4. Avantageusement, le rapport en volume de lait brut sur diluant (lait brut/diluant) est compris entre 1/0,1 et 1/3,9, entre 1/0,2 et 1/3,8, entre 1/0,4 et 1/3,7, entre 1/0,6 et 1/3,6, entre 1/0,8 et 1/3,5, entre 1/0,9 et 1/3,4, entre 1/1 et 1/3,3, entre 1/1,1 et 1/3,2, entre 1/1,2 et 1/3,2, entre 1/1,1 et 1/3,1, ou entre 1/1,5 et 1/3,5, entre 1/2 et 1/3,5, entre 1/2,5 et 1/3,5. De façon encore plus avantageuse, le rapport en volume de lait brut sur diluant (lait brut/diluant) est égal à 1/3.

Anticorps

10 Par « anticorps » ou « immunoglobuline », on entend une molécule comprenant au moins un domaine de liaison à un antigène donné et un domaine constant comprenant un fragment Fc capable de se lier aux récepteurs FcR. Chez la plupart des mammifères, comme l'homme et la souris, un anticorps est composé de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité à la molécule. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL) ; les chaînes lourdes étant composées d'un domaine variable (VH) et de 3 ou 4 domaines constants (CH1 à CH3 ou CH1 à CH4) selon l'isotype de l'anticorps. Chez quelques rares mammifères, comme les chameaux et les lamas, les anticorps sont constitués de seulement deux chaînes lourdes, chaque chaîne lourde comprenant un domaine variable (VH) et une région constante.

Les domaines variables sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, tandis que les domaines constants sont impliqués dans les propriétés biologiques, pharmacocinétiques et effectrices, de l'anticorps.

25 Contrairement aux domaines variables dont la séquence varie fortement d'un anticorps à un autre, les domaines constants sont caractérisés par une séquence en acides aminés très proche d'un anticorps à l'autre, caractéristique de l'espèce et de l'isotype, avec éventuellement quelques mutations somatiques. Le fragment Fc est naturellement composé de la région constante de la chaîne lourde à l'exclusion du domaine CH1, c'est-à-dire de la région charnière inférieure et des domaines constants CH2 et CH3 ou CH2 à CH4 (selon l'isotype). Chez les IgG1 humaines, le fragment Fc complet est composé de la partie C-terminale de la chaîne lourde à partir du résidu cystéine en position 226 (C226), la numérotation des résidus d'acides aminés dans le fragment Fc étant dans toute la présente description celle de l'index EU décrit dans Edelman et al-1969 et Kabat et al-1991. Les fragments Fc correspondants d'autres types d'immunoglobulines peuvent être identifiés aisément par l'homme du métier par des alignements de séquences.

Le fragment Fc γ est glycosylé au niveau du domaine CH2 avec la présence, sur chacune des 2 chaînes lourdes, d'un *N*-glycane lié au résidu asparagine en position 297 (Asn 297).

Les domaines de liaison suivants, situés dans le Fc γ , sont importants pour les propriétés biologiques de l'anticorps :

- 5 - domaine de liaison au récepteur FcRn, impliqué dans les propriétés pharmacocinétiques (demi-vie *in vivo*) de l'anticorps :
Différentes données suggèrent que certains résidus situés à l'interface des domaines CH2 et CH3 sont impliqués dans la liaison au récepteur FcRn.
- domaine de liaison à la protéine du complément C1q, impliqué dans la réponse CDC
10 (pour « cytotoxicité dépendante du complément ») : situé dans le domaine CH2;
- domaine de liaison aux récepteurs FcR, impliqué dans les réponses de type phagocytose ou ADCC (pour « cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps ») : situé dans le domaine CH2.

Au sens de l'invention, le fragment Fc d'un anticorps peut être naturel, tel que défini ci-dessus, ou bien avoir été modifié de diverses façons. Les modifications peuvent inclure la
15 délétion de certaines parties du fragment Fc et/ou différentes substitutions d'acides aminés susceptibles d'affecter les propriétés biologiques de l'anticorps. En particulier, lorsque l'anticorps est une IgG, il peut comprendre des mutations destinées à augmenter la liaison au récepteur Fc γ RIII (CD16), telles que décrites dans WO00/42072, Shields et al-2001, Lazar et
20 al-2006, WO2004/029207, WO/2004063351, WO2004/074455. Des mutations permettant d'augmenter la liaison au récepteur FcRn et donc la demi-vie *in vivo* peuvent également être présentes, comme décrit par exemple dans Shields et al-2001, Dall'Acqua et al-2002, Hinton et al-2004, Dall'Acqua et al-2006(a), WO00/42072, WO02/060919A2, WO2010/045193, ou
25 WO2010/106180A2. D'autres mutations, comme celles permettant de diminuer ou d'augmenter la liaison aux protéines du complément et donc la réponse CDC, peuvent ou non être présentes (voir WO99/51642 ; WO2004074455A2 ; Idusogie et al-2001 ; Dall'Acqua et al-2006(b) ; et Moore et al-2010).

L'anticorps produit dans le lait soumis au procédé de purification selon l'invention peut être recombinant (lorsqu'il est codé par une séquence hétérologue insérée dans le génome d'un
30 animal non humain transgénique) ou non-recombinant (lorsqu'il est codé par une ou plusieurs séquences naturellement produite(s) par l'animal non humain, potentiellement hyperimmunisé). Dans le cas d'un anticorps recombinant, l'anticorps produit par l'animal non-humain transgénique est monoclonal. En revanche, dans le cas d'un anticorps non-recombinant, l'anticorps produit par l'animal non-humain non-transgénique (en particulier
35 hyperimmunisé contre un antigène donné) sera de type polyclonal monospécifique ou

polyspécifique. Dans un mode de réalisation préféré, l'anticorps purifié dans le cadre du procédé de purification selon l'invention est un anticorps monoclonal.

Par « anticorps polyclonal monospécifique » ou « composition d'anticorps polyclonal monospécifique », on entend une composition comprenant des molécules d'anticorps dirigées
5 contre un même antigène, mais produites par plusieurs clones de lymphocytes B stimulés lors de l'immunisation par l'antigène. Un anticorps polyclonal monospécifique regroupe donc plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre un même antigène et produits par des clones de lymphocytes B distincts. Les différents anticorps monoclonaux inclus dans l'anticorps polyclonal monospécifique peuvent être dirigés contre des épitopes (ou partie d'antigène)
10 différents du même antigène.

Par « anticorps polyclonal polyspécifique » ou « composition d'anticorps polyclonal polyspécifique », on entend une composition comprenant des molécules d'anticorps dirigées contre différents antigènes et produites par plusieurs clones de lymphocytes B stimulés lors de leur rencontre avec l'un des antigènes. L'ensemble des anticorps présents dans le lait d'un
15 animal non-humain transgénique est un exemple d'anticorps polyclonal polyspécifique.

Par « anticorps monoclonal » ou « composition d'anticorps monoclonal », on entend une composition comprenant des molécules d'anticorps possédant une spécificité antigénique identique et unique. Les molécules d'anticorps présentes dans la composition sont susceptibles de varier au niveau de leurs modifications post-traductionnelles, et notamment
20 au niveau de leurs structures de glycosylation ou de leur point isoélectrique, mais ont toutes été codées par les mêmes séquences de chaînes lourde et légère et ont donc, avant toute modification post-traductionnelle, la même séquence protéique. Certaines différences de séquences protéique, liées à des modifications post-traductionnelles (comme par exemple le clivage de la lysine C-terminale de la chaîne lourde, la déamidation de résidus asparagine
25 et/ou l'isomérisation de résidus aspartate), peuvent néanmoins exister entre les différentes molécules d'anticorps présentes dans la composition.

L'anticorps monoclonal purifié dans le cadre de l'invention peut avantageusement être chimérique, humanisé, ou humain.

Par anticorps « chimérique », on entend désigner un anticorps qui contient une région variable (chaîne légère et chaîne lourde) naturelle dérivée d'un anticorps d'une espèce donnée en association avec les régions constantes de chaîne légère et chaîne lourde d'un anticorps d'une espèce hétérologue à ladite espèce donnée. Avantageusement, si la composition d'anticorps monoclonal pour son utilisation en tant que médicament selon l'invention comprend un anticorps monoclonal chimérique, celui-ci comprend des régions
30 constantes humaines. Partant d'un anticorps non humain, un anticorps chimérique peut être préparé en utilisant les techniques de recombinaison génétique bien connues de l'homme du

métier. Par exemple, l'anticorps chimérique pourra être réalisé en clonant pour la chaîne lourde et la chaîne légère un ADN recombinant comportant un promoteur et une séquence codant pour la région variable de l'anticorps non humain, et une séquence codant pour la région constante d'un anticorps humain. Pour les méthodes de préparation d'anticorps chimériques, on pourra par exemple se référer au document Verhoeven et al-1988.

Par anticorps « humanisé », on entend désigner un anticorps qui contient des régions CDRs dérivées d'un anticorps d'origine non humaine, les autres parties de la molécule d'anticorps étant dérivées d'un (ou de plusieurs) anticorps humains. En outre, certains des résidus des segments du squelette (dénommés FR) peuvent être modifiés pour conserver l'affinité de liaison (Jones et al-1986 ; Verhoeven et al-1988 ; Riechmann et al-1988). Les anticorps humanisés selon l'invention peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art telles les technologies de « CDR grafting », de « resurfacing », de SuperHumanisation, de « Human string content », de « FR libraries », de « Guided selection », de « FR shuffling » et de « Humaneering », comme résumé dans la revue de Almagro et al-2008.

Par anticorps « humain », on entend un anticorps dont toute la séquence est d'origine humaine, c'est-à-dire dont les séquences codantes ont été produites par recombinaison de gènes humains codant pour les anticorps. En effet, il est maintenant possible de produire des animaux transgéniques (par ex. des souris) qui sont capables, sur immunisation, de produire un répertoire complet d'anticorps humains en l'absence de production endogène d'immunoglobuline (voir Jakobovits et al-1993(a) ; Jakobovits et al-1993(b) ; Bruggermann et al-1993 ; Duchosal et al-1992 ; brevets US5,591,669 ; US 5,598,369 ; US 5,545,806 ; US 5,545,807 ; US 6,150,584). Les anticorps humains peuvent aussi être obtenus à partir de banques de présentation de phages (Hoogenboom et al-1991 ; Marks et al-1991 ; Vaughan et al-1996).

Les anticorps peuvent être de plusieurs isotypes, en fonction de la nature de leur région constante : les régions constantes γ , α , μ , ϵ et δ correspondent respectivement aux immunoglobulines IgG, IgA, IgM et IgD.

L'anticorps avantageusement purifié dans le cadre de l'invention peut avantageusement être d'isotype IgG, IgA, IgM, ou IgD, avantageusement selon les proportions présentes dans le lait brut. Dans un mode de réalisation, l'anticorps purifié dans le cadre de l'invention est d'isotype IgA. Avantageusement, l'anticorps purifié dans le cadre de l'invention est d'isotype IgG. En effet, l'isotype IgG montre une capacité à engendrer une activité ADCC (« Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity », soit Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps) chez le plus grand nombre d'individus (humains) et est donc principalement utilisé pour les applications pharmaceutiques d'anticorps monoclonaux.

Les régions constantes γ comprennent plusieurs sous-types : γ_1 , γ_2 , γ_3 , ces trois types de régions constantes présentant la particularité de fixer le complément humain, et γ_4 , créant ainsi les sous-isotypes IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4. De préférence, l'anticorps purifié par le procédé de l'invention est d'isotype IgG1, IgG2, IgG3 et/ou IgG4. Avantageusement, la proportion de chaque sous-isotype d'IgG présent dans le lait brut est conservée à l'issue du procédé selon l'invention.

À titre d'exemple non-limitatif d'anticorps (monoclonaux ou polyclonaux, de préférence monoclonaux) d'intérêt que l'on souhaite exprimer chez un mammifère non humain transgénique, on peut citer un anticorps dirigé contre l'un des antigènes suivants :

- 10 • Rhésus D, les anticorps anti-Rhésus D étant utiles pour la prévention de l'alloimmunisation chez les individus Rhésus-négatifs,
- Antigènes exprimés par des cellules cancéreuses, susceptibles d'être ciblés dans le traitement de cancers, et notamment : CD20, Her2/neu, CD52, EGFR, EPCAM, CCR4, CTLA-4 (CD152), CD19, CD22, CD3, CD30, CD33, CD4, CD40, CD51 (Integrin alpha-V),
15 CD80, CEA, FR-alpha, GD2, GD3, HLA-DR, IGF1R (CD221), phosphatidylsérine, SLAMF7 (CD319), TRAIL-R1, TRAIL-R2.
- Antigènes exprimés par des cellules infectées par des agents pathogènes, susceptibles d'être ciblés dans le traitement d'infections par des agents pathogènes, et notamment : antigènes de *Clostridium difficile*, antigènes de *Staphylococcus aureus* (notamment ClfA et acide lipoteichoïque), antigènes du cytomegalovirus (notamment la glycoprotéine B), antigènes d'*Escherichia coli* (notamment toxine Shiga-like, sous unité IIB), antigènes du virus respiratoire syncytial (Protéine F notamment), antigènes du virus de l'hépatite B, antigènes du virus Influenza A (Hémagglutinine notamment),
20 antigènes de *Pseudomonas aeruginosa* sérotype IATS O11, antigènes du virus de la rage (Glycoprotéine notamment), phosphatidylsérine.
- Antigènes exprimés par des cellules immunitaires, susceptibles d'être ciblés pour le traitement de maladies autoimmunes, et notamment : CD20, CD52, CD25, CD2, CD22, CD3, et CD4.
- Antigènes anti-cytokines, et notamment anti-TNF α

30 Avantageusement, l'anticorps (monoclonal ou polyclonal, de préférence monoclonal) purifié à partir du lait brut est choisi parmi les anticorps dirigés contre les antigènes suivants : Rhésus D, CD2, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD40, CD51 (Integrin alpha-V), CD52, CD80, CTLA-4 (CD152), SLAMF7 (CD319), Her2/neu, EGFR, EPCAM, CCR4, CEA, FR-alpha, GD2, GD3, HLA-DR, IGF1R (CD221), phosphatidylsérine, TNF α , TRAIL-R1, TRAIL-R2,
35 antigènes de *Clostridium difficile*, antigènes de *Staphylococcus aureus*, antigènes du cytomegalovirus, antigènes d'*Escherichia coli*, antigènes du virus respiratoire syncytial,

antigènes du virus de l'hépatite B, antigènes du virus Influenza A, antigènes de *Pseudomonas aeruginosa* sérotype IATS O11, antigènes du virus de la rage, ou phosphatidylsérine.

Avantageusement, la concentration en anticorps du lait brut avant l'étape a) de précipitation à l'acide caprylique est comprise entre 3 et 50 g/L. De manière avantageuse, le lait brut
 5 présent une concentration en anticorps entre 3 et 45 g/L, entre 3 et 40 g/L, entre 3 et 35 g/L, entre 3 et 30 g/L, entre 3 et 25 g/L, entre 5 et 45 g/L, entre 5 et 40 g/L, entre 5 et 35 g/L, entre 5 et 30 g/L, entre 5 et 25 g/L, entre 10 et 45, entre 10 et 40 g/L, entre 10 et 35 g/L, entre 10 et 30 g/L, entre 10 et 25 g/L, entre 15 et 45, entre 15 et 40 g/L, entre 15 et 35 g/L, entre 15 et 30 g/L, entre 315 et 25 g/L, entre 16 et 24 g/L, entre 17 et 23 g/L, entre 18
 10 et 22 g/L, ou entre 19 et 21 g/L. De manière encore plus avantageuse, la concentration en anticorps du lait brut est égale à 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L, 10 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 13 g/L, 14 g/L, 15 g/L, 16 g/L, 17 g/L, 18 g/L, 19 g/L, 20 g/L, 21 g/L, 22 g/L, 23 g/L, 24 g/L, ou 25 g/L. La concentration en la concentration en anticorps du lait brut peut être déterminée par l'homme de métier au vu de ses connaissances générales. À titre d'exemple
 15 non-limitatif, la concentration en anticorps peut être déterminé par ELISA, EIA, RIA, néphélométrie, immunodiffusion radiale (Mancini et al-1965) ou immunosensor (Campanella et al-2009). De préférence, la concentration en anticorps du lait brut est déterminée par un test ELISA.

Étape a)

20 L'étape a) du procédé selon l'invention est une étape de précipitation à l'acide caprylique. Cette étape permet à la fois de clarifier le lait brut (éventuellement congelé puis décongelé et/ou dilué), de purifier de façon très importante l'anticorps, et d'inactiver/éliminer les pathogènes (participant ainsi à l'amélioration de la sécurité biologique de la composition). En d'autres termes, l'étape a) revient à combiner, en une seule étape, l'équivalent d'une
 25 étape de purification, d'une étape de clarification et d'une étape de sécurisation biologique. Lors de cette étape, l'acide caprylique est mélangé au lait brut (éventuellement congelé puis décongelé et/ou dilué). Il est à noter que cette étape permet une purification bien plus efficace qu'une simple étape d'acidification à l'acide acétique, qui ne permet pas de diminuer suffisamment la quantité de certaines protéines de lait, telle que la β -
 30 lactoglobuline. Ainsi, de façon très avantageuse, l'étape a) du procédé permet de précipiter les β -lactoglobulines.

L'acide caprylique, de formule $C_8H_{16}O_2$, est un acide gras saturé à chaîne linéaire aussi appelée l'acide 1-heptanecarboxylique, octanoïque, octoïque, ou octique (voir aussi CAS Reg. No. 124-07-2 ; et les brevets US 2821534 et US 3053869). Par « acide caprylique » on entend

ici l'acide caprylique sous forme acide ainsi que sous la forme de sel de caprylate, tel que du caprylate de sodium ou du caprylate de potassium. Tout sel de caprylate peut néanmoins être envisagé. Avantageusement, ledit sel de caprylate est un sel pharmaceutiquement acceptable. Avantageusement, l'acide caprylique est utilisé à l'étape a) sous forme acide.

- 5 De façon avantageuse, le pourcentage final (masse/masse) d'acide caprylique par rapport au lait brut (masse d'acide caprylique / masse de lait brut x 100) mis en œuvre à l'étape a) est compris entre 0,5 et 3,0 %, entre 0,6 et 2,9 %, entre 0,7 et 2,8 %, entre 0,8 et 2,7 %, entre 0,9 et 2,6 %, entre 1 et 2,5 %, entre 1 et 2,4 %, entre 1 et 2,3 %, entre 1 et 2,2 %, entre 1 et 2,1 %, entre 1,3 et 3 %, entre 1,3 et 2,5 % entre 1,3 et 2,2 % entre 1,3 et 2 %, encore plus
- 10 avantageusement entre 0,5 et 2,5 %, entre 1 et 2,5 %, entre 1 et 2 %, entre 1,5 et 2,0 %. De manière encore plus avantageuse, le pourcentage (masse/masse) d'acide caprylique par rapport au lait mis en œuvre à l'étape a) est compris entre 1,0 et 2,5%, de préférence entre 1,3 et 2,0 %, et notamment de 1,7% ou d'environ 1,7 % ($1,7 \pm 0,1\%$).

- Selon un premier mode de réalisation, l'acide caprylique est ajouté en une seule fois. Selon
- 15 un deuxième mode de réalisation, l'acide caprylique est ajouté en plusieurs fois, en particulier en 2 fois. Dans le cadre de la présente invention, l'acide caprylique est avantageusement ajouté en une seule fois.

Selon un premier mode de réalisation, l'acide caprylique est ajouté sur une durée de temps inférieure à 10 minutes, avantageusement inférieure à 5 minutes.

- 20 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'acide caprylique est laissé en contact sur une durée de temps supérieure à 5 minutes, supérieure à 10 minutes, avantageusement supérieure à 30 minutes, avantageusement comprise entre 1 et 2 heures.

Après ajout de l'acide caprylique au lait brut à l'étape a), ladite composition est appelée ici « mélange ».

- 25 Selon un mode particulier de l'invention, le pH du mélange est avantageusement ajusté par ajout d'un acide approprié, notamment choisi parmi l'acide acétique et l'acide citrique. Dans certains modes de réalisation du procédé selon l'invention, le pH est ajusté par ajout d'un acide fort, éventuellement dilué. Dans un mode de réalisation du procédé selon l'invention, le pH est ajusté par l'ajout d'acide acétique. La diminution du pH est importante pour
- 30 permettre la précipitation et permet aussi avantageusement d'améliorer la sécurité biologique du mélange, comme certains virus sont inactivés à des pH acides. Selon un mode particulier de l'invention, après addition de l'acide caprylique à l'étape a) mais avant toute autre étape (e.g. d'incubation ou de filtration), le pH du mélange est avantageusement ajusté à une valeur inférieure à 5, plus avantageusement à une valeur inférieure à 4,8. Selon

un mode particulier de l'invention, le pH du mélange est avantageusement ajusté à une valeur comprise entre 4,0 et 5,0, entre 4,1 et 4,9, entre 4,2 et 4,8, entre 4,2 et 4,7, plus avantageusement entre 4,2 et 4,6, entre 4,2 et 4,6, ou entre 4,3 et 4,6. Selon un mode particulier de l'invention, après addition de l'acide caprylique à l'étape a), le pH du mélange est avantageusement ajusté à une valeur de 4,3. Cette valeur est optimale pour la précipitation des éléments du lait considérés comme des contaminants de l'anticorps non désirés et donc pour la purification de l'anticorps, tandis qu'une valeur de 4,6 est optimale pour l'inactivation des virus. Selon l'aspect que l'on veut favoriser, l'homme du métier pourra choisir une valeur finale de pH dans les gammes indiquées ci-dessus et notamment entre 4,0 et 4,8.

Avantageusement, l'étape a) de précipitation permet la formation d'un précipité comprenant des caséines ainsi que d'autres protéines non-désirées du lait telles que la β -lactoglobuline, des lipides, éventuellement de l'acide caprylique et certains pathogènes.

Avantageusement, l'étape a) de précipitation permet également d'inactiver et/ou éliminer des pathogènes, et notamment des virus susceptibles d'être présents dans le lait brut avant la mise en œuvre de l'étape b) de séparation et ce sans l'ajout d'autres composés au mélange. Plus particulièrement, les inventeurs ont démontré que les virus non-enveloppés, tel que le virus PPV, sont précipités par l'acide caprylique alors que les virus enveloppés, tel que le virus X-MLV, sont inactivés. Ainsi, le procédé selon l'invention permet de réduire le titre viral infectieux de plus de 4 logs décimaux pour chacun de ces types de virus.

Avantageusement, l'étape a) de précipitation permet de réduire la teneur en virus infectieux de type enveloppés (X-MLV par exemple) et/ou la teneur en virus infectieux de type non enveloppés (PPV par exemple) susceptibles d'être présents dans le lait brut d'au moins 4 log (logarithmes décimaux).

Avantageusement, l'anticorps (monoclonal ou polyclonal, de préférence monoclonal, et avantageusement d'isotype IgG et/ou IgA) reste majoritairement sous forme soluble, dans la phase aqueuse.

Étape b)

Après l'étape a) de précipitation du lait brut par l'acide caprylique, le précipité et la phase aqueuse sont séparés de manière à récupérer la solution comprenant l'anticorps.

De façon optionnelle, l'étape b) de séparation permettant d'éliminer le précipité peut être précédée en outre d'une étape d'incubation du mélange, par exemple pendant 1 à 4 heures. Ladite étape d'incubation permet d'améliorer la sécurisation biologique du mélange,

notamment en augmentant l'inactivation virale qui a lieu. Avantageusement, l'étape d'incubation permet également d'optimiser la formation du précipité. Avantageusement, l'étape de séparation est précédée d'une étape d'incubation du mélange pendant 1 à 4 heures, 1 à 3 heures, ou 1 à 2 heures. Avantageusement, l'étape de séparation est précédée par d'une
 5 étape d'incubation du mélange égale à 2 heures. Pendant le temps de l'incubation, le mélange peut être sous agitation ou non. Selon un mode préféré, pendant le temps de l'incubation le mélange n'est pas sous agitation. À titre d'exemple non-limitatif, l'étape d'incubation peut être effectuée à température ambiante, par exemple entre 20 et 25 °C.

La séparation du précipité et de la phase aqueuse comprenant l'anticorps peut être réalisée
 10 par toute méthode de séparation connue de l'homme du métier. À titre d'exemple non-limitatif, on peut utiliser une technique classique de séparation liquide/solide telle que l'égouttage ou le pressage mécanique. L'étape de séparation peut également être réalisée par centrifugation et/ou par filtration, par exemple par filtration tangentielle, par exemple par microfiltration tangentielle, par filtration en profondeur ainsi que par des combinaisons de
 15 celles-ci.

Avantageusement, dans le procédé selon l'invention, l'étape b) de séparation du précipité et de la phase aqueuse comprenant l'anticorps est réalisée par filtration en profondeur. Dans ce mode de réalisation particulier, les lipides de la crème et les acides gras tels que l'acide caprylique sont avantageusement retenus par le filtre en même temps que le précipité
 20 protéique.

Par « filtration en profondeur », on entend un procédé de filtration dans lequel le lit de filtration dans sa totalité est utilisé pour piéger les particules en suspension dans le fluide. Le fluide traverse ainsi le lit de filtration dans sa totalité, les particules étant piégées à la surface du lit de filtration ainsi que dans les vides et/ou les pores du lit de filtration. La
 25 filtration en profondeur peut être réalisée sur des matrices à base de fibres de cellulose, de cellulose régénérée, de polypropylène, ou de leurs combinaisons. Ces matrices de filtration peuvent comprendre des composés minéraux tels que de la perlite, et/ou des diatomites, par exemple la terre de diatomée. À titre d'exemple, la matrice utilisée pour la filtration en profondeur peut comprendre de la cellulose, du propylène, de la perlite et/ou de la terre de
 30 diatomée.

Avantageusement, la filtration en profondeur est réalisée sur une matrice à base de fibres de cellulose, et comprend de préférence de la perlite, ledit filtre pouvant être facilement choisi par l'homme de métier. Le seuil de coupure de la matrice peut être compris dans une gamme allant de 10 µm à 80 µm, par exemple de 20 µm à 50 µm. À titre d'exemple non-limitatif, le
 35 filtre peut être un filtre de type Seitz® T3500, T2600, ou T5500 (Pall Corporation).

Avantageusement, le seuil de coupure dudit filtre est compris entre 10 et 80 μm , de préférence entre 20 et 50 μm . Avantageusement, le filtre est un filtre de 4 à 5 mm d'épaisseur, composé de fibres de cellulose et de perlite, avec un seuil de coupure entre 10 et 50 μm , par exemple de type Seitz® T3500.

- 5 Par « seuil de coupure » on entend ici le diamètre de la particule la plus petite qui est retenue à 90 % par la matrice.

Selon certains modes de réalisation, la filtration en profondeur est réalisée en présence d'un adjuvant de filtration. Ainsi selon un mode préférentiel de l'invention, la filtration en profondeur est réalisée en présence d'au moins un adjuvant de filtration (utilisé en
10 alluvionnage ou en précouche), qui peut être minéral (par exemple la terre de diatomée ou la perlite) ou organique (tel que la cellulose), avantageusement de la terre de diatomée (aussi appelé Kieselguhr).

Dans un autre mode de réalisation, lorsque l'étape de séparation est réalisée par centrifugation, l'homme du métier sera en mesure de déterminer les conditions de
15 centrifugation appropriées. À titre d'exemple non-limitatif, le mélange peut être centrifugé à 4000 x g pendant 15 min. De préférence, les anticorps restent majoritairement sous forme soluble, dans la phase aqueuse localisée entre la crème (en surface) et le culot (protéines précipitées).

Avantageusement, l'étape b) de séparation permet de diminuer la teneur (en g/L) en lipides
20 (en particulier en triglycérides) de la composition d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30%, par exemple d'au moins par 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, voire d'au moins 90% par rapport à la teneur (en g/L) initiale en lipides (en particulier en triglycérides) présente dans le lait brut, avant la mise en œuvre des étapes a) de précipitation et b) de séparation. Ainsi, la composition obtenue à l'issue de l'étape b) présente avantageusement une concentration (en
25 g/L) en lipides inférieure d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30%, par exemple d'au moins 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, voire d'au moins 90% à celle du lait brut (éventuellement congelé puis décongelé et/ou dilué). En particulier, la composition obtenue à l'issue de l'étape b) présente avantageusement une concentration (en g/L) en triglycérides inférieure d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30%, par exemple d'au moins 40%, 50%, 60%, 70%,
30 80%, voire d'au moins 90% à celle du lait brut (éventuellement congelé puis décongelé et/ou dilué). À titre d'exemple non-limitatif, la teneur (en g/L) en lipides peut être mesurée par dosage colorimétrique.

Avantageusement, à l'issue de l'étape b) de séparation la teneur (en g/L) en protéines (en particulier en caséine et/ou β -lactoglobuline) de la composition est diminuée d'au moins 20%,

de préférence d'au moins 30%, par exemple d'au moins par 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, encore d'au moins 90% par rapport à la teneur initiale (en g/L) en protéines (en particulier en caséine et/ou β -lactoglobuline) présente dans le lait brut, avant la mise en œuvre des étapes a) de précipitation et b) de séparation. Ainsi, la composition obtenue à l'issue de l'étape b) présente avantageusement une concentration (en g/L) en protéines inférieure d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30%, par exemple d'au moins 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, voire d'au moins 90% à celle du lait brut (éventuellement congelé puis décongelé et/ou dilué). En particulier, la composition obtenue à l'issue de l'étape b) présente avantageusement une concentration (en g/L) en caséines inférieure d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30%, par exemple d'au moins 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, voire d'au moins 90% à celle du lait brut (éventuellement congelé puis décongelé et/ou dilué). La composition obtenue à l'issue de l'étape b) présente également avantageusement une concentration (en g/L) en β -lactoglobuline inférieure d'au moins 20%, de préférence d'au moins 30%, par exemple d'au moins 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, voire d'au moins 90% à celle du lait brut (éventuellement congelé puis décongelé et/ou dilué). À titre d'exemple non-limitatif, la teneur (en g/L) en protéines, tel que la caséine, peut être mesurée par néphélométrie et ELISA.

Avantageusement, l'étape b) de séparation permet de réduire la teneur en virus infectieux de type non-enveloppés (PPV par exemple) susceptibles d'être présents dans le lait brut d'au moins 4 log (logarithmes décimaux).

À l'issue des étapes a) et b) selon l'invention, le rendement en anticorps est avantageusement d'au moins 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, de préférence d'au moins 75% (rendement en poids, calculé par comparaison du poids en anticorps dans la solution à l'issue des étapes a) et b) au poids en anticorps dans le lait brut avant l'étape a)).

Étape optionnelle c)

Après l'étape b) de séparation du précipité et de la phase aqueuse, l'acide caprylique résiduel est éliminé lors de l'étape optionnelle c) de manière à récupérer la composition comprenant l'anticorps à un rendement et/ou à une pureté élevée, avantageusement sous une forme susceptible d'être utilisée en thérapie. Lorsque l'étape b) de séparation est effectuée par centrifugation, cette étape permettra également d'éliminer des éventuels agrégats qui pourraient toujours être présents dans le mélange. De préférence, l'étape c) est effectuée par une étape de filtration en profondeur, réalisée sur une matrice comprenant du charbon actif, avantageusement du charbon actif compressé. L'homme du métier sait choisir un filtre approprié selon ses connaissances générales. À titre d'exemple non-limitatif, le filtre pouvant être mis en œuvre à cette étape pourrait être choisi parmi : le filtre Seitz® AKS5

(PALL Corporation), le filtre Seitz® AKS6 (PALL Corporation), le filtre R53 SLP (3M), le filtre Millistak+® CR40 (Millipore), et le filtre Purafix® (Filtrox). Avantageusement, le filtre mis en œuvre est le filtre Seitz® AKS5 (PALL Corporation).

- Avantageusement, à l'issue de l'étape optionnelle c) de filtration au charbon actif, une composition comprenant l'anticorps est obtenue. Avantageusement, à l'issue de l'étape c) selon l'invention, le rendement en anticorps est avantageusement d'au moins 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, de préférence d'au moins 70% (rendement en poids, calculé par comparaison du poids en anticorps dans la solution à l'issue des étapes a) à c) au poids en anticorps dans le lait brut avant l'étape a)).
- 10 Avantageusement, à l'issue de l'étape optionnelle c) selon l'invention, la quantité résiduelle d'acide caprylique (exprimée en % masse/masse) est inférieure à 1%, avantageusement inférieure à 0,5%, encore plus avantageusement inférieure à 0,3%, de préférence inférieure à 0,1% de la quantité initiale d'acide caprylique (elle-même exprimée en % masse/masse). Ainsi, par exemple, si 1% (masse/masse) d'acide caprylique est ajouté à l'étape a), alors la
- 15 quantité résiduelle d'acide caprylique à l'issue de l'étape c) est avantageusement inférieure à 0,01% (masse/masse).

Ladite composition est avantageusement adaptée à une administration directe par voie orale ou par voie nasale. Par « administration directe » on entend ici que ladite composition comprenant l'anticorps n'a pas besoin de subir d'étape supplémentaire de purification, de formulation, de concentration, et/ou d'élimination virale, mais peut être directement administrée chez un sujet ou conditionnée (e.g. répartie dans des contenants) pour une utilisation pharmaceutique future comprenant une administration par voie orale ou nasale.

20

Ladite composition comprenant l'anticorps est préférablement conservée à environ 4°C (4±2°C) à l'issue de l'étape c) de filtration au charbon actif. En effet, les inventeurs ont démontré que les anticorps contenus dans la composition sont stables pendant plusieurs mois à environ 4°C (4 ± 2°C). Il ne serait donc pas obligatoire d'ajouter un excipient quelconque, tel qu'un agent stabilisant, à l'issue du procédé de l'invention.

25

Autres étapes ultérieures optionnelles

Même si le procédé décrit ci-dessus permet d'obtenir un rendement et une pureté d'anticorps suffisant en très peu d'étapes, dans certains cas, il peut toutefois être avantageux d'effectuer une ou plusieurs étapes supplémentaires de purification, concentration, de sécurisation biologique et/ou de mise en forme pharmaceutique. Le procédé selon l'invention peut ainsi en outre comprendre au moins une étape supplémentaire, et postérieure à l'étape

30

b) de centrifugation ou de filtration à travers un filtre en profondeur (lorsque l'étape c) n'est pas mise en œuvre) ou l'étape c) de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif (lorsque celle-ci est mise en œuvre), choisie parmi les étapes de : concentration (par exemple par ultrafiltration, ultrafiltration tangentielle, microfiltration, et/ou diafiltration),
 5 purification (par exemple par chromatographie en phase inverse, chromatographie par interaction hydrophobe, chromatographie sur hydroxyapatite, chromatographie sur résine échangeuse de cations, chromatographie sur résine échangeuse d'anions, chromatographie d'affinité, chromatographie multimodale, chromatographie d'exclusion stérique), formulation (par exemple par ajout de composants, ou par diafiltration), sécurisation virale (par exemple
 10 par traitement solvant-détergent, pasteurisation, chauffage à sec, ou nanofiltration), et les combinaisons d'au moins deux de celles-ci.

À titre d'exemple non-limitatif, il peut être avantageux de concentrer l'anticorps compris dans la composition, par exemple par une étape d'ultrafiltration et/ou de diafiltration, notamment afin d'obtenir une concentration plus élevée en anticorps et/ou de formuler
 15 l'anticorps dans une composition particulière.

À titre d'exemple non-limitatif, il peut également être avantageux de modifier la formulation de l'anticorps, par exemple si ledit l'anticorps est destiné à une administration ultérieure par voie parentérale, par exemple en changeant le tampon de la composition (notamment par diafiltration) et/ou en ajoutant au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

20 À titre d'exemple non-limitatif, il peut également être avantageux d'augmenter la pureté de la composition, par exemple par une étape de chromatographie.

À titre d'exemple non-limitatif, il peut également être avantageux d'augmenter la sécurité biologique de la composition face à un risque d'infection virale ou bactérienne, par exemple par une étape de filtration stérilisante, par la nanofiltration et/ou par une étape
 25 d'inactivation (par exemple, traitement solvant-détergent, pasteurisation, chauffage à sec).

Différentes combinaisons d'au moins deux de ces étapes supplémentaires peuvent également être ajoutées aux étapes a) à c) du procédé selon l'invention.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé selon l'invention comprend en outre, après l'étape b) de centrifugation ou de filtration à travers un filtre en profondeur (lorsque
 30 l'étape c) n'est pas mise en œuvre) ou l'étape c) de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif (lorsque celle-ci est mise en œuvre), une ou plusieurs des étapes suivantes visant à adapter la composition à une administration particulière et/ou à augmenter la pureté du produit :

- une étape de concentration (notamment ultrafiltration et/ou diafiltration) ;
- une étape de purification (notamment chromatographie) ;
- une étape de formulation ; et/ou
- une étape de sécurisation biologique

5 Selon un aspect particulier, l'invention a pour objet un procédé de purification d'une composition comprenant un anticorps à partir du lait brut selon les étapes a) à b) profondeur (lorsque l'étape c) n'est pas mise en œuvre) ou selon les étapes a) à c) (lorsque celle-ci est mise en œuvre) ci-dessus, ledit procédé comprenant, après l'étape b) de centrifugation ou de filtration à travers un filtre en profondeur (lorsque l'étape c) n'est pas mise en œuvre) ou

10 l'étape c) de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif (lorsque celle-ci est mise en œuvre), l'une quelconque des combinaisons d'étapes suivantes.

Combinaison 1 :

- une étape d'ultrafiltration ou de diafiltration ; et
- une étape de formulation.

15 **Combinaison 2 :**

- une étape de formulation ;
- une étape d'ultrafiltration ; et
- une étape de sécurisation biologique.

Combinaison 3 :

- 20
- une étape de diafiltration ; et
 - une étape de sécurisation biologique.

Étape de concentration

L'étape de concentration vise à améliorer la concentration en anticorps de la composition. Elle peut être réalisée par ultrafiltration et/ou diafiltration. Lorsqu'une étape de diafiltration

25 est utilisée, celle-ci peut également permettre d'adapter la formulation de la composition.

L'étape de concentration peut se situer après l'étape b) (lorsque l'étape c) n'est pas mise en œuvre) ou l'étape c) (lorsque celle-ci est mise en œuvre) mais avant toute autre étape, entre une étape supplémentaire de chromatographie et une étape supplémentaire de sécurisation biologique, ou après une étape de sécurisation biologique.

Les méthodes et les filtres adaptés à une étape d'ultrafiltration et/ou de diafiltration sont bien connus par l'homme du métier. Une telle étape peut notamment être réalisée en utilisant des cassettes de type centramate 30 kDa (commercialisées par Pall) ou Pellicon 2 30 kDa (commercialisées par Merck Millipore) avec un tampon de dialyse dans le cas où l'ultrafiltration se situe après une étape d'inactivation virale et/ou d'élimination virale. À titre d'exemple non-limitatif, l'ultrafiltration est une ultrafiltration tangentielle, par exemple sur une membrane ayant un seuil de coupure inférieur à 150 kDa.

Étape de purification

L'étape de purification vise à améliorer la pureté en anticorps de la composition comprenant l'anticorps en éliminant différents contaminants, tels que les protéines ou les lipides résiduels du lait, ou des éventuels solvants et/ou détergents susceptibles d'avoir été utilisés lors d'une étape précédente. Lorsque la composition comprenant l'anticorps est destinée à une utilisation thérapeutique et est administrée, par exemple, par voie intraveineuse, il peut être souhaitable que la composition soit appauvrie en certains anticorps particuliers. Ainsi, lorsque l'anticorps d'intérêt est un anticorps monoclonal chimérique (avec une région constante humaine), humanisé ou humain, il peut être avantageux que la composition soit appauvrie en anticorps endogènes de l'animal. Lorsque l'anticorps d'intérêt est un anticorps polyclonal produit par l'animal (notamment hyperimmunisé), il peut être avantageux d'éliminer certains autres anticorps de l'animal, notamment ceux ayant certaines spécificités antigéniques, tels que les anticorps anti-A et/ou anti-B pour minimiser les risques d'hémolyse, directement corrélés aux taux de ces anticorps.

Bien que toute étape de purification supplémentaire puisse être utilisée (par exemple une nouvelle précipitation), en cas d'étape additionnelle de purification, celle-ci sera avantageusement une étape de chromatographie.

En amont de cette étape de purification additionnelle, le procédé peut également comprendre des étapes visant à modifier ou ajuster la concentration en anticorps de la composition, la conductivité ou encore le pH de la composition avant la mise en œuvre de l'étape de purification additionnelle.

À titre d'exemple non-limitatif, l'étape de purification additionnelle peut être effectuée par une chromatographie d'affinité ou par une chromatographie sur résine échangeuse d'ions, tel qu'une chromatographie sur résine échangeuse d'anions ou une chromatographie sur résine échangeuse de cations. Ces techniques sont bien connues de l'homme du métier (voir, par exemple, Heegaard-1998 ; Hage et Tweed-1997. Lors de cette étape, la composition

comprenant l'anticorps issue de l'étape précédente est appliquée sur la membrane appropriée, qui peut être choisie par l'homme du métier selon ses connaissances générales.

Avantageusement, l'étape de chromatographie consiste en une chromatographie échangeuse d'ions ou une chromatographie d'affinité, de façon plus avantageuse l'étape de chromatographie consiste en une chromatographie sur résine échangeuse d'anions ou une chromatographie sur résine échangeuse de cations.

Lorsque l'étape de chromatographie est réalisée par chromatographie d'affinité, le ligand utilisé peut être, de façon non-limitatif, un peptide, un microprotéine (e.g. 25-200 monomères), un peptidomimétique, une protéine, telle que la protéine A, un anticorps, un fragment d'anticorps ou un aptamère, tel qu'un aptamère d'ADN ou d'ARN. Un aptamère approprié peut être sélectionné par l'homme du métier sur la base de ses connaissances générales, par exemple en utilisant le technologie SELEX. Avantageusement, l'aptamère fixe les anticorps IgG et/ou IgA de façon spécifique, et ce, quel que soit le profil de glycosylation de l'anticorps. Plus avantageusement, l'aptamère fixe au moins un sous-isotype d'IgG, encore plus avantageusement l'aptamère selon l'invention fixe la région Fc d'un anticorps IgG. Avantageusement, l'aptamère a une constante de dissociation d'IgG de 10^{-6} M au maximum, plus avantageusement de 1.10^{-12} M à 1.10^{-6} M. Avantageusement, l'aptamère fixe les immunoglobulines IgG à un pH de 5,5.

À titre d'exemple, un aptamère comprenant la séquence 5'-CACGGTATAGTCTCGCCA-3' (SEQ ID NO : 1), 5'-AGGGGCTGGGGTGTGGTTCTGGC-3' (SEQ ID NO : 2), ou 5'-CCCCTAATCAGTGGC-3' (SEQ ID NO : 3) est particulièrement avantageux. À titre alternatif, un aptamère comprenant une séquence dérivée de la séquence de SEQ ID NO : 1, 2 ou 3 par la délétion, l'insertion, ou la substitution d'un, deux, trois, quatre ou cinq nucléotide(s) est également particulièrement avantageux.

Lorsqu'une composition appauvrie en certains anticorps autre que celui souhaité est désirée, par exemple pour éliminer d'éventuels anticorps anti-A/anti-B, une chromatographie d'affinité, par exemple telle que décrite dans la demande WO 2007/077365, est avantageusement utilisée.

À titre d'exemple non-limitatif, selon le type de ligand utilisé, celui-ci peut être immobilisé sur la matrice de chromatographie d'affinité par des forces Van de Waals, ou par des interactions non-covalentes spécifiques. Par exemple, l'immobilisation du ligand d'affinité peut dépendre d'un couplage de type ligand/anti-ligand (e.g. biotine/anticorps anti-biotine), ou d'un marqueur lié à l'aptamère, tel qu'un le biotine (pour une fixation à l'avidine ou la streptavidine), une lectine (pour une fixation à un groupement sucre), un marqueur c-myc, un

marqueur thioredoxine, etc. La matrice de l'affinité peut être de tout type, et est sélectionnée selon son usage. À titre d'exemple, le matrice peut être un gel polymérique, un filtre, ou une membrane, composé d'agarose, de cellulose, ou d'un ou plusieurs polymères synthétiques tel que le polyacrylamide, le polyéthylène, le polyamide, ou des dérivés de ceux-ci.

Selon un mode de réalisation particulier, lorsque l'anticorps d'intérêt est un anticorps monoclonal chimérique (avec une région constante humaine), humanisé ou humain, l'élimination des anticorps endogènes résiduels peut être réalisée par chromatographie d'affinité, par exemple en utilisant une résine d'affinité capable de retenir sélectivement l'anticorps (par exemple selon laquelle l'anticorps est retenu par l'antigène qu'il reconnaît de façon spécifique), l'anticorps étant ensuite récupéré par élution, ou une résine d'affinité capable de retenir sélectivement les immunoglobulines endogènes. À titre d'exemple, la matrice d'affinité peut comprendre un ligand capable de lier sélectivement des anticorps endogènes, ce ligand pouvant être un anticorps ou un fragment d'anticorps reconnaissant la région constante des anticorps de l'espèce d'animal non humain utilisé pour produire l'anticorps dans son lait.

Lorsque l'étape de chromatographie est réalisée par chromatographie échangeuse de cations, ladite étape de chromatographie peut être effectuée, par exemple, sur une résine ayant pour matrice un gel d'agarose réticulé, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-SO_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs à base de dextrane. La conductivité et/ou le pH de la composition issue de l'étape précédente peut avantageusement être ajustée avant application sur la résine.

Le gel d'agarose réticulé, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-SO_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs à base de dextrane utilisé à l'étape c) peut avantageusement se présenter sous forme de billes ayant un diamètre moyen compris entre 10 et 200 μm , avantageusement entre 50 et 150 μm , et notamment d'environ 90 μm .

Des exemples de matrices constituées d'un gel d'agarose réticulé, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-SO_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs incluent les matrices suivantes : Capto™ S (matrice de gel d'agarose réticulé, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-SO_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs à base de dextrane sous forme de billes d'un diamètre moyen de 90 μm , commercialisée par GE Healthcare Life Sciences), Fractogel® EMD SO_3^- (matrice de polymère de méthacrylate, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-SO_3^-$) par l'intermédiaire de longues chaînes de polymère linéaire d'acrylamide comprenant 15 à 50 unités d'acrylamide, sous forme de billes d'un diamètre moyen de 30 (type S) ou 65 (type M) μm), et Eshmuno®S (matrice de polyvinyléther

réticulé hydrophile, sur laquelle sont greffés des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs, sous forme de billes d'un diamètre moyen de 75-95 μm). Avantageusement, la résine ayant pour matrice un gel d'agarose réticulé, sur lequel sont greffés est choisie parmi une matrice de gel d'agarose réticulé, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs à base de dextrane sous forme de billes d'un diamètre moyen de 90 μm (résine Capto™ S notamment), une matrice de polymère de méthacrylate, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) par l'intermédiaire de longues chaînes de polymère linéaire d'acrylamide comprenant 15 à 50 unités d'acrylamide, sous forme de billes d'un diamètre moyen de 30 (type S) ou 65 (type M) μm (résine Fractogel® EMD SO_3^- notamment) et une matrice de polyvinyléther réticulé hydrophile, sur laquelle sont greffés des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs, sous forme de billes d'un diamètre moyen de 75-95 μm (résine Eshmuno®S notamment), plus avantageusement la résine est une matrice de gel d'agarose réticulé, sur lequel sont greffés des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) par l'intermédiaire de bras espaceurs à base de dextrane sous forme de billes d'un diamètre moyen de 90 μm (résine Capto™ S notamment).

L'éluion peut notamment être réalisée en augmentant la conductivité et/ou le pH.

Le débit de l'étape de chromatographie est avantageusement ajusté à une valeur correspondant à un temps de résidence compris entre 1 et 3 minutes, avantageusement entre 1,5 et 2,5 minutes et notamment d'environ 2 minutes. En fonction du volume de gel, le débit approprié peut être calculé sur la base de la formule suivante : débit (mL/min) = volume de gel (mL) / temps de résidence (min).

Lorsque l'étape de chromatographie est réalisée par chromatographie échangeuse d'anions, ladite chromatographie échangeuse d'anions peut être effectuée, par exemple, sur une membrane hydrophile de polyéthersulfone revêtue d'un polymère réticulé sur lequel sont greffés des groupements amine quaternaire (Q).

Cette membrane possède avantageusement une taille moyenne de pores comprise entre 0,5 et 1 μm , avantageusement entre 0,6 et 0,9 μm , entre 0,7 et 0,9 μm , et notamment d'environ 0,8 μm .

La membrane comprend avantageusement plusieurs couches de polyéthersulfone revêtue d'un polymère réticulé sur lequel sont greffés des groupements amine quaternaire (Q), avantageusement entre 10 et 20 couches, notamment entre 14 et 18 couches, et en particulier 16 couches.

Un exemple d'une telle membrane est la membrane Mustang[®] Q (membrane hydrophile de 16 couches de polyéthersulfone ayant une taille moyenne de pores de 0,8 µm, revêtue d'un polymère réticulé sur lequel sont greffés des groupements amine quaternaire (Q)) commercialisée par Pall.

- 5 La composition d'anticorps issue de l'étape précédente peut être appliquée sur une membrane hydrophile de polyéthersulfone revêtue d'un polymère réticulé sur lequel sont greffés des groupements amine quaternaire (Q).

La conductivité et/ou le pH de la composition comprenant l'anticorps recombinant issue de l'étape précédente peut avantageusement être ajustée avant application sur la membrane.

10 *Étape de formulation*

- Afin d'adapter la composition comprenant l'anticorps issue du procédé selon l'invention à une utilisation pharmaceutique, la composition peut subir une étape de formulation, par exemple par l'addition d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou par tout autre changement de composition de ladite composition comprenant l'anticorps, tel qu'un changement de tampon. Avantageusement, l'étape de formulation ne nécessite pas d'étape spécifique supplémentaire, mais peut avoir lieu lors d'une étape de diafiltration, par exemple lorsqu'un simple changement de tampon est désiré. Dans ce cas, l'étape de diafiltration peut servir à la fois à concentrer et à formuler l'anticorps.
- 15

- Dans d'autre cas, l'étape de formulation peut être une étape supplémentaire, séparée de l'étape de concentration.
- 20

- Avantageusement, lors de l'étape de formulation, la composition comprenant l'anticorps sera additionnée d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Dans la présente description, on entend désigner par véhicule pharmaceutiquement acceptable, un composé ou une combinaison de composés entrant dans une composition pharmaceutique ne provoquant pas de réactions secondaires et qui permet par exemple la facilitation de l'administration du ou des composés actifs, l'augmentation de sa durée de vie et/ou de son efficacité dans l'organisme, l'augmentation de sa solubilité en solution ou encore l'amélioration de sa conservation. Ces véhicules pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et seront adaptés par l'homme de l'art en fonction de la nature et du mode d'administration du ou des composés actifs choisis.
- 25
- 30

L'homme du métier saura choisir le ou les excipients à associer à l'anticorps en fonction de la forme galénique et de la voie d'administration souhaitée. À cette fin, l'homme du métier pourra se référer aux ouvrages de référence suivants : Pharmaceutical Formulation

Development of Peptides and Proteins (S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis, 2000), Remington : The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wilkins ; Twenty first Edition, 2005) et, Handbook of Pharmaceuticals Excipients, American Pharmaceutical Association (Pharmaceutical Press; 6th revised édition, 2009).

- 5 Le ou les excipients présents dans les compositions selon l'invention peuvent être choisis, de façon non-limitatif, parmi les diluants, les agents cryoprotecteurs et/ou lyoprotecteurs, les agents stabilisants, les agents antioxydants, les agents régulateurs de pH, les agents tampons, les agents tensio-actifs, les agents détergents etc.

Étape de sécurisation biologique (e.g. inactivation et/ou élimination virale)

- 10 Afin d'éliminer et/ou inactiver les virus et/ou autres macromolécules pathogènes qui n'auraient pas été éliminés par la précipitation à l'acide caprylique, tels que le prion, agent responsable des encéphalopathies spongiformes transmissibles, et les petits virus non enveloppés plus résistants aux traitements d'inactivation virale, une étape supplémentaire de sécurisation biologique peut en outre être souhaitable. Cette étape peut comprendre
15 notamment une étape d'inactivation virale et/ou d'élimination virale, par exemple par nanofiltration. Cette étape est particulièrement souhaitable lorsque la composition obtenue par le procédé décrit ci-dessous est destinée à une administration par voie parentérale, telle que la voie intraveineuse, sous-cutanée, intradermique ou intramusculaire.

- Par « étape d'inactivation virale », on entend une étape dans laquelle les virus ne sont pas
20 éliminés de la solution (des antigènes peuvent encore être détectés), mais sont rendus inactifs et donc inoffensifs. Ces étapes incluent notamment le chauffage à sec, la pasteurisation, et le traitement solvant-détergent ou par un détergent seul. Ces différentes étapes d'inactivation virale sont bien connues de l'homme du métier (voir notamment les directives de l'OMS concernant les procédures d'inactivation et d'élimination virale destinées
25 à assurer la sécurité virale des produits dérivés du plasma sanguin humain, disponibles sur le site internet de l'OMS).

- Avantageusement, dans le procédé selon l'invention, l'étape d'inactivation virale est une étape de traitement solvant-détergent ou de traitement par un détergent seul. Un traitement solvant-détergent est réalisée par traitement de la solution par un mélange de solvant,
30 notamment le tri-(N-butyl)-phosphate (TnBP), et d'un détergent, notamment le Polysorbate 80 (Polyoxyéthylène (20) sorbitan monooléate) ou le polyoxyéthylène-p-t-octylphénol (Triton X-100, N° CAS 9002-93-1), dans des conditions appropriées. Un exemple d'étape de traitement solvant-détergent est réalisé en présence de 1% (poids/volume) de Polysorbate 80

et 0,3% (volume/volume) de. L'étape d'inactivation virale peut également être réalisée par traitement par un détergent seul, tel que le Polysorbate 80 (Polyoxyéthylène (20) sorbitan monooléate) ou le polyoxyéthylène-p-t-octylphénol (Triton X-100, N° CAS 9002-93-1). Un exemple d'un tel traitement est une incubation pendant 30 à 120 minutes (en particulier pendant environ 1 heure) dans un milieu comprenant 0,5 à 2% (v/v) (notamment environ 1% v/v) de polyoxyéthylène-p-t-octylphénol (Triton X-100, N° CAS 9002-93-1).

Par « étape d'élimination virale » on entend une étape dans laquelle les virus sont éliminés de la solution, par exemple, par une étape de nanofiltration.

À titre d'exemple non-limitatif, la filtration stérilisante peut correspondre à

- 10 - la mise en œuvre d'une ou plusieurs étapes de filtration stérilisante à travers des filtres ayant une porosité de l'ordre de 0,1 à 0,5 μm (notamment d'environ 0,2 μm , par exemple avec un filtre Millipak de 0,22 μm) et/ou
- à travers un ou plusieurs nanofiltres de porosité comprise entre 100 et 15 nm, tels que les filtres de porosité 75 nm, 35 nm, 20 nm et/ou 15 nm par exemple
 - 15 ○ sur des filtres de porosité décroissante de 100 à 15 nm en particulier sur deux ou trois filtres disposés en série et possédant des seuils de rétention décroissants, par exemple de 100, 50 et 20 nm, ou de 75 et 20 nm, ou de 35 et 20 nm, ou de 20 et 15 nm
 - 20 ○ sur des filtres de même porosité, en particulier sur deux ou trois filtres disposés en série et possédant des seuils de rétention identiques, par exemple de 20 nm, ou de 15 nm.

Les filtres les plus couramment utilisés pour exclure les petits virus non-enveloppés, et pouvant être utilisés dans le cadre de la présente invention, sont les filtres Planova® commercialisés par Asahi Kasei, en particulier les filtres Planova® 15N et Planova® 20N, ayant respectivement une taille moyenne de pores de 15 et 19 nm. Ces filtres, constitués d'une membrane à fibres creuses formée de cellulose régénérée au cuprammonium sont caractérisés par une faible dispersité de la taille des pores (± 2 nm autour de la taille moyenne). À titre alternatif, un filtre Pegasus SV4 de Pall ou Viresolve® Pro (filtre ayant une double membrane asymétrique de polyéthersulfone retenant au moins 4 logs décimaux de virus ayant une taille d'au moins 20 nm, commercialisé par Merck-Millipore) peut être utilisé.

Avantageusement, l'étape de nanofiltration est réalisée avec un filtre ayant une double membrane de polyéthersulfone d'une porosité d'environ 20 nm. De tels filtres incluent notamment le filtre Viresolve® Pro (filtre ayant une double membrane asymétrique de polyéthersulfone d'une porosité d'environ 20 nm, commercialisé par Merck-Millipore) et le

filtre Virosart® CPV (filtre ayant une double membrane symétrique de polyéthersulfone d'une porosité d'environ 20 nm, commercialisé par Sartorius).

La nanofiltration est avantageusement réalisée en utilisant un filtre ayant une double membrane asymétrique de polyéthersulfone d'une porosité d'environ 20 nm, tel que le filtre Viresolve® Pro commercialisé par Merck-Millipore. Par « une porosité d'environ 20 nm », on entend que la taille moyenne des pores du filtre est comprise entre 17 et 25 nm, avantageusement entre 17 et 24 nm, entre 17 et 23 nm, entre 17 et 22 nm, entre 17 et 21 nm, entre 17 et 20 nm, entre 18 et 25 nm, entre 18 et 24 nm, entre 18 et 23 nm, entre 18 et 22 nm, entre 18 et 21 nm, entre 18 et 20 nm, entre 19 et 25 nm, entre 19 et 24 nm, entre 19 et 23 nm, entre 19 et 22 nm, entre 19 et 21 nm, entre 19 et 20 nm, entre 20 et 25 nm, entre 20 et 24 nm, entre 20 et 23 nm, entre 20 et 22 nm, ou entre 20 et 21 nm.

Dans un mode de réalisation avantageux, la nanofiltration comprend entre outre une étape préalable de filtration à travers un filtre en profondeur comprenant des fibres de cellulose, de la terre de diatomée et une résine chargée négativement (pré-filtre Viresolve PreFilter ou VPF) ou une membrane de polyéthersulfone d'une porosité de 0,22 µm fonctionnalisée par des groupements SO_3^- (pré-filtre Viresolve pro Shield notamment).

EXEMPLES

L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs suivants. Ces enseignements comprennent des alternatives, des modifications et des équivalents, tels que pourront être appréciés par un homme de métier.

EXEMPLE 1 : PROCÉDE SELON L'INVENTION, ÉTAPE A) DE PURIFICATION

Le procédé mis au point permet d'obtenir un produit de pureté intermédiaire en une seule étape sans aucune étape de clarification ou délipidation préalable du lait brut.

Matériels et méthodes

Une série d'essais a été réalisée en variant les conditions de l'étape a) de précipitation à l'acide caprylique, selon le **Tableau 1** ci-dessous. En particulier, la concentration en protéines totales du lait brut a varié entre 6 et 35 g/L, la concentration en acide caprylique entre 1,3, et 2,4 % par rapport au lait brut (masse/masse), et le pH été ajusté à une valeur de 4,05 à 5,20 par l'ajout d'acide acétique après ajout de l'acide caprylique.

Tableau 1 : Conditions opératoires des essais représentatifs :

Essai	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
Concentration en protéines totales (g/L)	31	35	12	6	9	14
Acide Caprylique (%)	2,4	2,0	1,6	1,8	1,7	1,3
pH ajusté (après addition acide caprylique et acide acétique)	4,05	5,20	4,25	4,31	4,20	4,50

Résultats

Comme indiqué dans le **Tableau 2** ci-dessus, on constate que le rendement et la pureté des IgG sont acceptables lorsque la concentration en protéines totales est comprise entre 6 et 14 g/L et le pourcentage en acide caprylique est compris entre 1,3 et 1,8 %. En effet, les deux essais ayant une concentration en protéines supérieure à 30 g/L et un pourcentage en acide caprylique supérieur à 2 % n'ont pas permis de réaliser les étapes b) et c) du procédé. Cependant, ces deux essais n'ont pas été sujets aux mêmes défauts. L'essai n°1 n'a pas généré de précipité, alors que l'essai n°2 a précipité mais la phase de précipité n'a pas pu être séparée de la phase aqueuse comprenant les immunoglobulines sous forme soluble.

10 Tableau 2 : Conditions opératoires des essais représentatifs :

Essai	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
Rendement (IgG, %)	Pas de précipitation	Précipitation, pas de séparation précipité/surnageant	61	40	57	60
Pureté (SDS-PAGE, %)			95	93	89	79

EXEMPLE 2 : PROCÉDE SELON L'INVENTION : ÉTAPE A) DE SECURISATION BIOLOGIQUE

À la suite des essais initiaux, un procédé optimisé a été mis en œuvre et les différents paramètres mesurés à l'issue de chaque étape, afin de déterminer l'effet de chaque étape sur une composition de lait brut, et plus particulièrement afin d'illustrer l'effet « trois-en-un » (délipidation, purification, et sécurisation biologique) de la précipitation à l'acide caprylique.

Matériels et méthodes

On utilise comme matériel de départ du lait brut de chèvre comprenant 40 g/L en protéines totales et 4 g/L d'IgG. 130 mL de lait brut de chèvre est dilué 1,22-fois avec de l'eau. 1 % v/v du virus X-MLV ou PPV est ajouté au lait brut dilué. Un échantillon, appelé ici « Échantillon de charge » est prélevé. L'acide caprylique est ajouté à une concentration finale de 1,29 % masse/masse (correspondant à 3,78 g d'acide caprylique) et la solution est homogénéisée pendant 5 minutes. Le pH est ajusté à $4,45 \pm 0,05$ avec de l'acide acétique.

La solution est incubée pendant deux heures à température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sans agitation. Un échantillon, appelé ici « Hold 1 » est prélevé.

De façon alternative, le pH de la solution est ajusté à $7,0 \pm 0,1$. Un échantillon, appelé ici « Hold 2 » a été prélevé.

- 5 La solution (pH maintenu à 4,45) est ensuite soumise à une étape de filtration en profondeur utilisant un filtre Seitz T3500 (Pall corporation) à température ambiante (i.e. $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Un échantillon, appelé ici « Échantillon intermédiaire » est prélevé. La solution est ensuite soumise à une deuxième étape de filtration en profondeur sur un filtre de type Seitz® AKS5 (Pall Corporation) à charbon actif à température ambiante (i.e. $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Cette deuxième
- 10 filtration retient à la fois les adjuvants de filtration et l'acide caprylique restant, ainsi que des éventuelles contaminants restants, tels que des protéines du lait. À l'issue de cette deuxième étape de filtration, un échantillon, appelé ici « Échantillon final » est prélevé.

La **Figure 1** illustre ce procédé.

Résultats

- 15 Les titres viraux ont été déterminés pour chaque échantillon. Plus particulièrement, le titre viral a été déterminé avant ajout d'acide caprylique (aussi appelé échantillon « Charge »), et après l'étape de précipitation (deux échantillons prélevés, appelés les échantillons « Hold 1 » et « Hold 2 »).

- Comme illustré dans le **Tableau 3** ci-dessous, le titre du virus X-MLV (virus à ARN enveloppé) détecté dans les échantillons « Hold 1 » et « Hold 2 » a été réduit par rapport au titre initial de plus de 4,8 logs décimaux. Le virus est donc inactivé par les conditions opératoires de l'étape a) (i.e. acide caprylique, pH, durée, température).
- 20

- En revanche, le virus PPV (virus non enveloppé) n'a pas été réduit de façon significative dans les échantillons Hold 1 et Hold 2. En revanche, le titre infectieux détecté à l'issue de l'étape b) montre une réduction du titre d'environ 4,5 logs décimaux, indiquant que les conditions opératoires de l'étape a) (i.e. pH, acide caprylique, durée, température), n'ont pas d'effet. Par contre, la réduction du titre infectieux à l'issue de l'étape b) démontre un effet de partition, ce virus étant précipité et séparé physiquement au cours de l'étape de séparation.
- 25

30 **Tableau 3 : Réduction des titres viraux**

	Facteur de réduction - Filtrat final	Commentaire
X-MLV	> 4,8 log*	Pas de virus détecté dans Hold 1 et Hold 2
PPV	4,5 log*	Pas de perte significative de virus dans Hold 1 et Hold 2

*Valeurs logarithmiques exprimées en logs décimaux.

Bien que par des mécanismes différents, le procédé selon l'invention a permis de réduire le titre viral de plus de 4 logs décimaux, à la fois pour le virus enveloppé X-MLV et pour le virus non enveloppé PPV.

5 EXEMPLE 3 : STABILITE DE LA COMPOSITION COMPRENANT L'ANTICORPS

La composition obtenue par le procédé a été placée à 4°C pendant plus de 6 mois.

Les IgG ainsi purifiées sont stables plusieurs mois à 4°C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Almagro et al. *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633 (2008) ;
- Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7 :33 (1993) ;
- Campanella et al., *Sensors* (Basel). 9(3) : 2202-2221 (2009) ;
- 5 Cibelli et al., *Science*, 280 : 1256-1258 (1998) ;
- Dall'Acqua et al., *J Immunol.*;169:5171 -80 (2002) ;
- Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.*;281 :2351 -24. (2006) (a) ;
- Dall'Acqua et al. *J Immunol* ; 177 :1129-1138 (2006) (b) ;
- Duchosal et al. *Nature* 355 : 258 (1992) ;
- 10 Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969) ;
- Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993) ;
- Gordon et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*;77:7380-4 (1980) ;
- Hage et Tweed, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 699(1-2):499-525 (1997) ;
- Handbook of Pharmaceuticals Excipients, American Pharmaceutical Association
15 (Pharmaceutical Press; 6th revised edition, 2009) ;
- Hinton et al., *J Biol Chem.* ; 279 :6213-6 (2004) ;
- Heegaard, *J. Mol. Recognit.* 11(1-6):141-8 (1998) ;
- Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227 : 381 (1991) ;
- Idusogie et al., *J Immunol.* ; 166 : 2571-5 (2001) ;
- 20 Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 :2551 (1993) (a) ;
- Jakobovits et al., *Nature*, 362 :255-258 (1993) (b) ;
- Jones et al., *Nature*, 321 : 522-525, (1986) ;
- Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service,
National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) ;
- 25 Lazar, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(11) : 4005-10 (2006) ;
- Mancini et al., *Immunohistochem*, 2 : 235-254 (1965) ;

Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) ;

Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222 : 581- 5 597 (1991) ;

Moore et al., *mAbs* 2:2, 181-189; March/April, (2010) ;

- 5 Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins (S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis 2000) ;

Remington : The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wilkins ; Twenty first Edition, 2005)

Riechmann et al., *Nature*, 332 : 323-327, (1988) ;

- 10 Ryan et al., *Science* ; 278 : 873 - 876 (1997) ;

Shields et al., *J Biol Chem.* 276(9) : 6591-604 (2001) ;

Vaughan et al. *Nature Biotech*, 14 : 309 (1996).

Verhoeyn et al., *BioEssays*, 8 : 74, (1988) ;

Wei et al., *Transgenic Res.* 20, 321-330 (2011).

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une composition comprenant un anticorps monoclonal à partir de lait brut d'un mammifère non humain exprimant ledit anticorps monoclonal dans son lait, comprenant :
- 5 a) une étape de précipitation du lait brut à l'acide caprylique,
- b) une étape de séparation consistant en une centrifugation ou une filtration à travers un filtre en profondeur, et optionnellement
- c) une étape de filtration à travers un filtre en profondeur à charbon actif.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le lait brut n'a subi aucune étape
10 préalable de clarification et/ou d'écémage et/ou d'acidification.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le pourcentage final (masse/masse) d'acide caprylique mis en œuvre à l'étape a) est compris entre 0,5 et 3,0 %, de préférence compris entre 1,0 et 2,5 %, de manière encore plus préférée entre 1,3% et 2,0% et est de préférence de 1,7 %.
- 15 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape a) après addition de l'acide caprylique le pH du mélange est ajusté à une valeur inférieure à 4,8, de préférence comprise entre 4,0 et 4,8, de préférence à une valeur de 4,3.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), le lait brut n'est pas dilué ou est dilué à un ratio (lait
20 brut/diluant, exprimé en volumes) allant de 1/0,1 à 1/4, de préférence égal à 1/3.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la concentration en protéines totales du lait brut avant l'étape a) de précipitation par l'acide caprylique est comprise entre 25 et 100 g/l, de préférence entre 30 et 60 g/l, de préférence égale à 50 g/l.
- 25 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la concentration en anticorps monoclonal du lait brut avant l'étape a) de précipitation par l'acide caprylique est comprise entre 3 et 50 g/l, de préférence entre 5 et 30 g/l et de préférence égale à 20 g/l.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'étape b)
30 est une filtration en profondeur effectuée à l'aide d'un filtre composé de fibres de cellulose.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite filtration en profondeur réalisée à l'étape b) est effectuée à l'aide d'un filtre ayant un seuil de coupure comprise entre 10 et 80 μm , de préférence entre 20 et 50 μm .

5 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une étape additionnelle, et postérieure à l'étape b) lorsque l'étape c) n'est pas mise en œuvre choisie parmi les étapes de :

- i. concentration, notamment par ultrafiltration et/ou diafiltration,
- ii. purification, notamment par chromatographie échangeuse d'ions ou d'affinité, de préférence une chromatographie d'affinité utilisant des ligands aptamères,
- 10 iii. formulation, et/ou
- iv. sécurisation biologique, notamment une inactivation virale et/ou une élimination virale.

15 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une étape additionnelle, et postérieure à l'étape c) lorsque celle-ci est mise en œuvre, choisie parmi les étapes de :

- i. concentration, notamment par ultrafiltration et/ou diafiltration,
- ii. purification, notamment par chromatographie échangeuse d'ions ou d'affinité, de préférence une chromatographie d'affinité utilisant des ligands aptamères,
- iii. formulation, et/ou
- 20 iv. sécurisation biologique, notamment une inactivation virale et/ou une élimination virale.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel le mammifère non humain exprimant un anticorps monoclonal dans son lait est la lapine, la vache ou la chèvre.

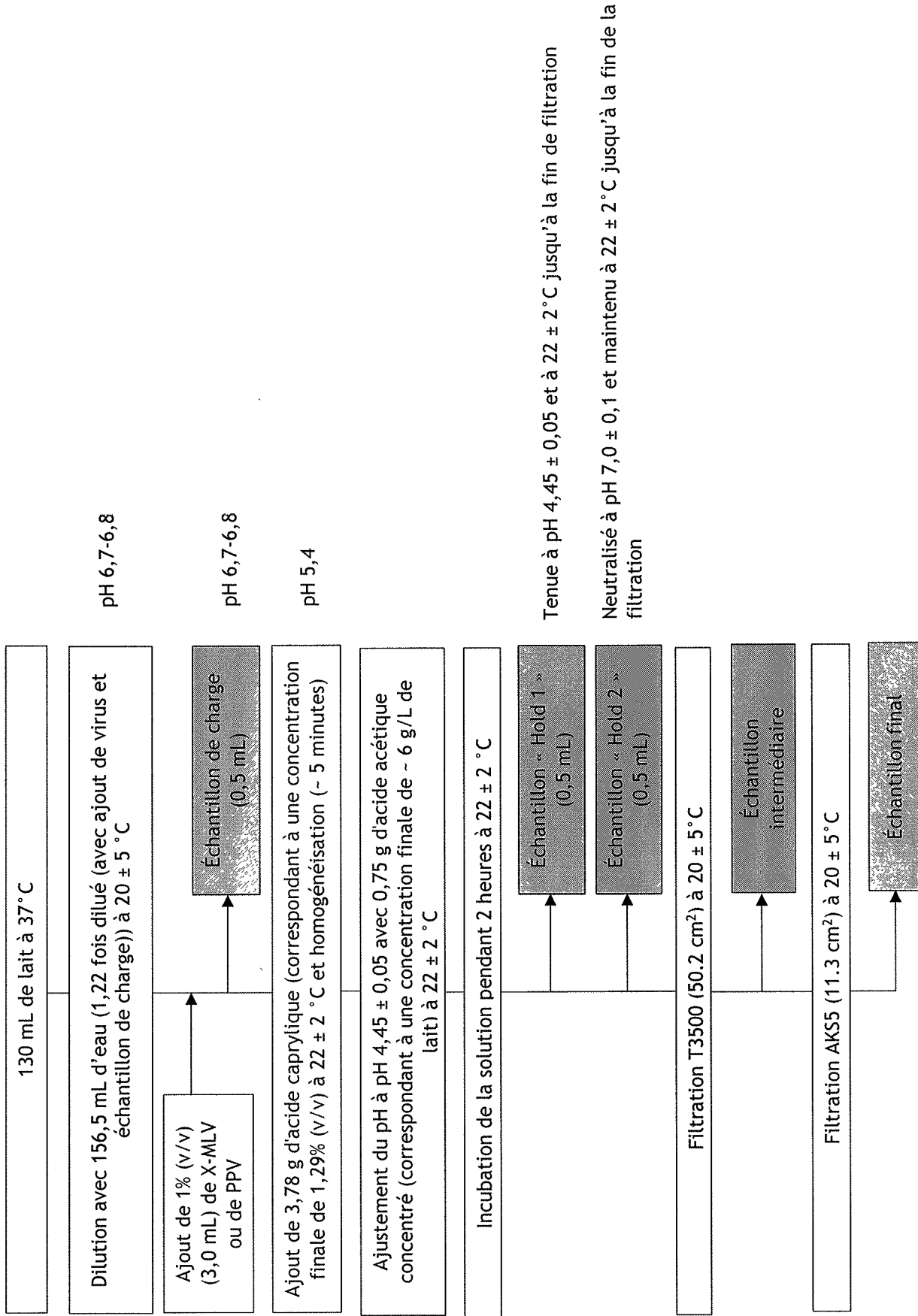


Figure 1

B250247FRD37542_Sequence listing.txt
SEQUENCE LISTING

<110> LFB SA

<120> PROCEDE DE PURIFICATION D'ANTICORPS A PARTIR DE LAIT BRUT

<130> B250247FRD37542

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> -

<223> Séquence aptamère no. 1

<400> 1

cacggtatag tctcgcca

18

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Séquence aptamère no. 2

<400> 2

aggggctggg gtgtggttct ggc

23

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Séquence aptamère no. 3

<400> 3

cccctaatca gtggc

15

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

A.J. GUIDRY ET AL: "A Method for Measuring Specific Antibodies in Bovine Lactal Secretions During the Nonlactating Period", JOURNAL OF DAIRY SCIENCE., vol. 79, no. 5, 1 mai 1996 (1996-05-01), pages 846-850, XP055513179, US ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76433-0

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

WO 2015/130222 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]) 3 septembre 2015 (2015-09-03)

MCLAREN R D ET AL: "The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunised with ovine alpha-lactalbumin", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 177, no. 1-2, 28 décembre 1994 (1994-12-28), pages 175-184, XP023992164, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/0022-1759(94)90154-6 [extrait le 1994-12-28]

WO 2015/056237 A2 (UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN [AT]) 23 avril 2015 (2015-04-23)

WO 2016/156752 A1 (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 6 octobre 2016 (2016-10-06)

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT