

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
25 juin 2020 (25.06.2020)



(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/128385 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 38/36 (2006.01) C07K 14/75 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2019/053235

(22) Date de dépôt international :

20 décembre 2019 (20.12.2019)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

18 73741 21 décembre 2018 (21.12.2018) FR

(71) Déposant : **LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES**

[FR/FR] ; ZA De Courtaboeuf, 3 Av des Tropiques, 91940
LES ULIS (FR).

(72) Inventeurs : **BATAILLE, Damien** ; 24 allée des Chardon-
nerets, 91540 ORMOY (FR). **OLLIVIER, Monique** ; 17
place Victor Hugo, 94270 LE KREMLIN BICETRE (FR).
TELLIER, Michel ; 6 rue Jean Bouin, 95600 EAUBONNE
(FR).

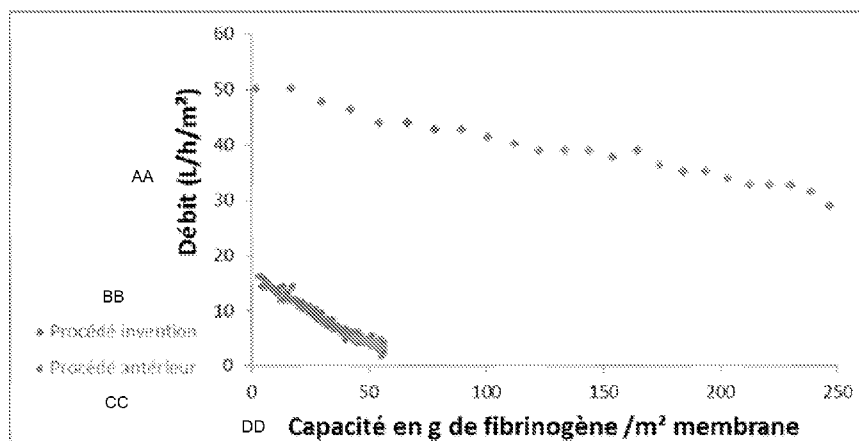
(74) Mandataire : **PLASSERAUD IP** ; 66 rue de la Chaussée
d'Antin, 75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,

(54) Title: METHOD FOR FILTERING FIBRINOGEN

(54) Titre : PROCÉDÉ DE FILTRATION DU FIBRINOGENE

[Fig. 1]



AA Flow rate (L/h/m²)
BB Method of the invention
CC Previous method
DD Capacity of fibrinogen in g / m² of membrane

(57) Abstract: Disclosed is a method for filtering a fibrinogen composition, comprising the following steps: a) purifying the fibrinogen composition by chromatographic purification using an elution buffer comprising arginine; b) optionally, at least one step of filtering the fibrinogen composition obtained by chromatographic elution in step a), on a filter having a pore size of between 0.08 μm and 0.22 μm , c) filtering the fibrinogen composition obtained by chromatographic elution in step a), or optionally obtained in step b), on a symmetrical filter having a pore size of between 15 nm and 25 nm, and preferably between 18 nm and 22 nm, and d) recovering the resulting fibrinogen solution, the filtering method being carried out without adding arginine after step a), at a high capacity and without a prior freezing and/or thawing step.

(57) Abrégé : Procédé de filtration d'une composition de fibrinogène, comprenant les étapes suivantes: a) purification par chromatographie de la composition de fibrinogène à l'aide d'un tampon d'élution comprenant de l'arginine; b) optionnellement, au moins une

[Suite sur la page suivante]

KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Publiée:

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

étape de filtration de la composition de fibrinogène obtenue par élution de chromatographie à l'étape a), sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08 µm et 0,22 µm, c) filtration de la composition de fibrinogène obtenue par élution de chromatographie à l'étape a), ou optionnellement obtenue en b), sur filtre symétrique ayant une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, de préférence comprise entre 18 nm et 22 nm, et d) récupération de la solution résultante de fibrinogène, ledit procédé de filtration étant réalisé sans ajout d'arginine après l'étape a), à une capacité élevée et sans étape préalable de congélation et/ou décongélation.

Description

Titre : Procédé de filtration du fibrinogène

Domaine technique

[0001] La présente invention concerne un procédé de filtration du fibrinogène,
5 ainsi que les préparations obtenues.

Technique antérieure

[0002] Le fibrinogène est une protéine essentielle de la coagulation sanguine, car sa polymérisation en fibrine insoluble formée au terme de la cascade de réactions qui gouvernent la coagulation, aboutit à la formation d'un caillot obturant la brèche
10 vasculaire, responsable du saignement. La mise en place du caillot est ainsi essentielle pour assurer l'arrêt du saignement. De plus, la fibrine formée au niveau de la plaie constitue un réseau fibrillaire qui assure la réparation tissulaire, donc la cicatrisation.

[0003] Des déficiences congénitales en fibrinogène peuvent conduire à de graves
15 pathologies. Pour soigner ces déficiences, il est nécessaire de disposer de concentrés de fibrinogène pouvant être administrés à des patients en traitement. D'autres pathologies peuvent également être soignées par des apports de fibrinogène, notamment en cas de pertes massives de sang, en cas de chirurgie ou de traumatismes par exemple, ou à la suite d'une coagulopathie de
20 consommation décompensée, par exemple la CIVD (coagulation intravasculaire disséminée).

[0004] Par conséquent, la mise à disposition de compositions comprenant du fibrinogène, notamment à des fins thérapeutiques, requiert des techniques de purification conduisant à un produit non seulement suffisamment purifié de
25 contaminants de nature diverse, tels que les protéines accompagnantes ou co-purifiées, les anticorps ou les protéases, mais de surcroît sécurisé sur le plan viral et sur le plan des ATNC couvrant le prion.

[0005] L'isolement de fractions enrichies en fibrinogène à partir du plasma est connu et a été décrit initialement par les travaux de Cohn et Nitschmann (Cohn et
30 al, J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946 et Kistler et al, Vox Sang., 7, 1962, 414-424).

Des méthodes plus récentes incorporent notamment des techniques de préparation par précipitation, chromatographie avec des étapes dédiées de sécurisation biologique.

- [0006]** Notamment, certains traitements d'inactivation virale classiques consistent
- 5 en un traitement thermique, par exemple une pasteurisation à 60°C pendant 20h en présence de stabilisants protecteurs ou un chauffage à sec du produit lyophilisé, et/ou un traitement chimique, tel que par solvant-détergent, destinés à rendre les compositions de fibrinogène compatibles avec un usage thérapeutique. Cependant, ils ne permettent pas d'assurer une totale inactivation des virus,
- 10 notamment des virus non enveloppés tels que le parvovirus B19 ou le virus de l'hépatite A ou B sans impacter la protéine. En particulier, si ces traitements ne sont pas parfaitement maîtrisés, ils peuvent entraîner la dégradation de la protéine (perte d'activité biologique, dénaturation par action enzymatique) et la formation de fragments, d'agrégats et de polymères.
- 15 **[0007]** Les autres méthodes de sécurisation biologique utilisent des techniques d'élimination virale, notamment à l'aide de filtrations. Néanmoins, ces techniques de filtration nécessitent des filtres de faible taille de pores (≤ 35 nanomètres) qui sont difficilement compatibles avec le fibrinogène. La demande EP1457497 décrit une étape de nanofiltration nécessitant une étape préliminaire de congélation et
- 20 de décongélation suivie d'une filtration qui doit être appliquée afin d'éliminer les agrégats, les polymères ou les contaminants indésirables tels que la fibronectine, un tel procédé nécessite également une dilution préalable de la solution à moins de 2 g/L pour limiter le colmatage précoce des filtres, ce qui représente des freins importants à l'industrialisation de tels procédés. Ainsi, les filtres de faible porosité
- 25 tel que le filtre Planova 20N, qui est classiquement utilisé dans l'industrie pour la sécurisation biologique, ne permettent pas d'atteindre une charge sur le filtre suffisante pour assurer un rendement et un coût de revient industriel acceptable. Les procédés utilisant des filtres dans de telles conditions ne permettent donc pas une mise en œuvre industrielle aisée ni une utilisation à capacité élevée, et
- 30 représentent un coût rédhibitoire dans l'implémentation d'un procédé de purification à l'échelle industrielle utilisant des lots de départ de plusieurs centaines ou milliers de litres.

[0008] En particulier de tels procédés ne permettent pas de traiter plus de 0,2 kg de fibrinogène par m² de membrane de nanofiltre sans inclure une étape préliminaire de congélation/décongélation et filtration du produit à nanofiltrer. Pour l'homme du métier la mise au point d'une étape de nanofiltration du fibrinogène dans des conditions permettant sa mise en œuvre industrielle (débit suffisant, peu colmatante, prix de revient acceptable) est donc connue comme étant une difficulté.

[0009] Par ailleurs, il est connu de l'homme du métier que les compositions de fibrinogène doivent contenir de l'arginine pour assurer leur stabilité. Les procédés d'obtention de compositions de fibrinogène utilisent ainsi l'arginine à différentes étapes du procédé, y compris lors de l'élution de chromatographie. Toutefois, la demande US2015/0366947 (exemple 7) enseigne que la nanofiltration de compositions de fibrinogène obtenues par élution de chromatographie en tampon comprenant de l'arginine ne serait pas facilitée par rapport à la nanofiltration de compositions de fibrinogène obtenues par élution de chromatographie en tampon ne comprenant pas d'arginine. En effet, selon ce procédé, l'utilisation d'un tampon d'élution de chromatographie comprenant de l'arginine entraîne le colmatage du filtre et nécessite l'ajout d'une étape d'ajustement avec de l'arginine de la composition obtenue après l'étape de chromatographie, afin de surmonter l'impossibilité de nanofiltrer la composition. Un procédé plus simple à mettre en œuvre présenterait donc un avantage.

Problème technique

[0010] La Demanderesse a donc cherché à mettre au point un procédé d'élimination des virus et d'autres contaminants indésirables (tels que les polymères, agrégats ou prion) d'une composition comprenant du fibrinogène, par filtration, qui permette l'obtention d'une composition de fibrinogène hautement sécurisée, ledit procédé étant facile à mettre en œuvre à l'échelle industrielle, et présentant un bon rendement et un prix de revient industriel acceptable.*

Exposé de l'invention

[0011] L'invention concerne, par conséquent, un procédé de de filtration d'une composition de fibrinogène, comprenant les étapes suivantes:

- a) purification par chromatographie de la composition de fibrinogène à l'aide d'un tampon d'élution comprenant de l'arginine ;
- b) optionnellement, au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène obtenue par élution de chromatographie à l'étape a), sur filtre ayant
- 5 une taille de pores comprise entre 0,08 μm et 0,22 μm ,
- c) filtration de la composition de fibrinogène obtenue par élution de chromatographie à l'étape a), ou optionnellement obtenue en b), sur filtre symétrique ayant une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, de préférence comprise entre 18 nm et 22 nm, et
- 10 d) récupération de la solution résultante de fibrinogène, ledit procédé de filtration étant réalisé sans ajout d'arginine après l'étape a), à une capacité d'au moins 0,2 kg de fibrinogène/m² et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement congelée et/ou décongelée.

[0012] Une telle solution permet de résoudre les problèmes posés par les

15 solutions connues de l'état de la technique et notamment d'obtenir une solution en fin d'étape d) hautement sécurisée biologiquement.

[0013] En effet et avantageusement, le procédé selon l'invention ne nécessite pas l'ajout d'une étape d'ajustement avec de l'arginine de la composition obtenue après l'étape de chromatographie. Il a été en effet démontré que des

20 concentrations croissantes d'arginine dans le tampon d'élution permettent d'augmenter la capacité de filtration et n'entraînent pas de colmatage du filtre. Une étape d'ajustement ultérieur avec de l'arginine n'est donc pas nécessaire, simplifiant ainsi la mise en œuvre industrielle du procédé.

[0014] Le procédé selon l'invention permet donc avantageusement la filtrabilité,

25 sur filtre symétrique de taille de pores d'environ 20 nm, d'une composition comprenant du fibrinogène sans étape de congélation/décongélation préalable, ni dilution préalable à partir d'une solution de fibrinogène pré-purifié par chromatographie et éluée par tampon comprenant de l'arginine, et sans ajout d'arginine après l'étape de purification par chromatographie.

30 **Brève description des dessins**

[0015] D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après, et à l'analyse des dessins annexés, sur lesquels :

Fig. 1

- 5 [0016] [Fig. 1] montre la capacité en g de fibrinogène/m² de membrane en fonction du débit (L/H/m²) du procédé selon l'invention (filtre symétrique) comparativement à un procédé antérieur (filtre asymétrique)

Description des modes de réalisation

- 10 [0017] Les dessins et la description ci-après contiennent, pour l'essentiel, des éléments de caractère certain. Ils pourront donc non seulement servir à mieux faire comprendre la présente invention, mais aussi contribuer à sa définition, le cas échéant.

- [0018] Dans la présente demande, par « capacité élevée » on entend une charge de fibrinogène par surface de membrane, exprimée en kg de fibrinogène par m² de membrane, supérieure ou égale à 0,2, de préférence supérieure ou égale à 0,25, de préférence supérieure ou égale à 0,3, de préférence supérieure ou égale à 0,35, de préférence supérieure ou égale à 0,4, de préférence supérieure ou égale à 0,45, de préférence supérieure ou égale à 0,5, de préférence supérieure ou égale à 1, de préférence supérieure ou égale à 2, de préférence supérieure ou égale à 3, de préférence supérieure ou égale à 5 kg/m².

[0019] De manière particulièrement avantageuse, la capacité élevée correspond à une charge de fibrinogène par surface de membrane comprise entre 0,2 et 5 kg/m², encore plus avantageusement entre 0,2 et 2,5 kg/m².

- 25 [0020] Ainsi, la Demanderesse a trouvé qu'il était possible d'obtenir, à l'échelle industrielle, des compositions de fibrinogène, hautement sécurisées, exemptes de virus, et en particulier de virus de petite taille, notamment non enveloppés, tel que le B19, et d'autres contaminants indésirables (tels que les polymères, agrégats ou prion), par la mise en œuvre d'un procédé de filtration flexible et simple qui permet une sécurisation avec une étape de nanofiltration du fibrinogène conservant son
- 30 intégrité moléculaire à un cout de production acceptable. Un tel procédé simple,

rapide et à prix de revient industriel acceptable, est aisément mis en œuvre à l'échelle industrielle, ce qui conduit à une optimisation accrue de la sécurisation biologique de compositions comprenant du fibrinogène. Enfin, un tel procédé de filtration permet une charge protéique élevée avec un rendement important après
5 filtration.

[0021] En outre, un tel procédé est optimal, car il ne nécessite pas notamment :

- des étapes préalables de congélation/décongélation destinées à éliminer les agrégats ou contaminants indésirables,
- et/ou des étapes de dilution préalable, qui diminuent la concentration protéique
10 et rallongent les temps de filtration,
- et/ou des étapes d'élimination de l'arginine dans les étapes précédentes de purification, ce qui permet de garder un fibrinogène stabilisé,
- et/ou une étape d'ajustement avec de l'arginine de la composition obtenue après l'étape de purification par chromatographie réalisée à l'aide d'un tampon d'élution
15 comprenant de l'arginine.

[0022] Selon l'invention, on peut utiliser plusieurs sources de matière première contenant du fibrinogène. Le procédé selon l'invention utilise ainsi une composition de fibrinogène, notamment de différentes sources. La composition de fibrinogène peut ainsi être issue de plasma sanguin, de préférence de fractions
20 plasmatiques, de surnageant de culture cellulaire ou de lait d'animaux transgéniques.

[0023] Dans un mode de réalisation particulier, la composition comprenant du fibrinogène (ou composition de fibrinogène) soumise au procédé de l'invention est du plasma sanguin ou une fraction plasmatique, de préférence une fraction
25 plasmatique obtenue à partir de plasma sanguin pré purifié.

[0024] Par « fraction plasmatique obtenue à partir de plasma sanguin prépurifié », on entend toute partie ou sous-partie du plasma sanguin humain, ayant fait l'objet d'une ou plusieurs étapes de purification. Lesdites fractions plasmatiques incluent ainsi le surnageant de plasma cryoprécipité, le cryoprécipité de plasma (remis en
30 suspension), la fraction I obtenue par fractionnement éthanolique (selon la méthode de Cohn ou de Kistler & Nitschmann), les éluats de chromatographies et

les fractions non adsorbées des colonnes de chromatographie, y compris des chromatographies multicolennes, et les filtrats.

[0025] Dans un mode de réalisation de l'invention, la composition de fibrinogène soumise au procédé de l'invention subie une étape supplémentaire de chromatographie. Ainsi, selon un mode de réalisation, la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention est un éluat de chromatographie ou une fraction non adsorbée de colonne de chromatographie, y compris de chromatographie multicolennes.

[0026] Ainsi, dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition de fibrinogène soumise au procédé de l'invention est une fraction plasmatique obtenue à partir de cryosurnageant ou de cryoprécipité remis en suspension.

[0027] Selon l'invention, le « surnageant de plasma cryoprécipité », ou « cryosurnageant », correspond à la phase liquide obtenue après décongélation de plasma congelé (cryoprécipitation). Notamment, le cryosurnageant peut être obtenu par congélation de plasma sanguin à une température comprise entre -10°C et -40°C , puis décongélation douce à une température comprise entre 0°C et $+6^{\circ}\text{C}$, préférentiellement entre 0°C et $+1^{\circ}\text{C}$, suivie d'une centrifugation du plasma décongelé pour séparer le cryoprécipité et le cryosurnageant. Le cryoprécipité est un concentré en fibrinogène, fibronectine, facteur von Willebrand et facteur VIII, tandis que le cryosurnageant contient les facteurs du complément, les facteurs vitamine K dépendants tels que la protéine C, la protéine S, la protéine Z, le facteur II, le facteur VII, le facteur IX et le facteur X, du fibrinogène, les immunoglobulines et l'albumine.

[0028] Par « composition de fibrinogène n'étant pas préalablement congelée et/ou décongelée », il est entendu que la composition de fibrinogène qui est soumise à l'étape b) si elle s'applique, ou par défaut soumise directement à l'étape c), n'est pas congelée et/ou décongelée avant cette étape b) ou c).

[0029] Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, la fraction plasmatique soumise au procédé de l'invention peut être obtenue selon le procédé décrit par la Demanderesse dans la demande EP1739093. Selon ce mode, la fraction plasmatique utilisée est de préférence obtenue comme suit :

On utilise de préférence du cryosurnageant de plasma humain. Ce cryosurnageant de plasma est soumis à une précipitation éthanolique par la méthode de Cohn, selon des conditions connues de l'homme du métier, notamment de façon telle que la concentration d'éthanol dans le plasma considéré
5 soit de 8 à 10 % (v/v).

Le surnageant et le précipité ainsi obtenus sont ensuite centrifugés. Le précipité constitue la fraction I de Cohn constituée majoritairement de fibrinogène (pureté environ 70 %).

Cette fraction I de Cohn prépurifiée est remise en suspension et lavée par
10 dispersion.

Après centrifugation, la pâte de précipité purifié (fraction I de Cohn purifiée) est récupérée puis solubilisée.

La solution ainsi obtenue est ensuite soumise à une élimination des facteurs procoagulants par traitement au gel d'alumine à un pH de 6,9-7,1.

15 Après filtration, cette solution prépurifiée est soumise à un premier traitement d'inactivation virale par solvant-détergent en présence de Tween®-TnBP.

La solution prépurifiée ainsi obtenue est injectée sur une colonne chromatographique remplie d'un gel échangeur d'anions DEAE Macroprep (Bio-Rad, France), préalablement équilibrée en tampon constitué de chlorure de sodium et de citrate trisodique, ajusté à un pH de 8,0.
20

L'élution du fibrinogène est effectuée par un tampon d'élution approprié, par exemple contenant du chlorure de sodium 1 M et un mélange constitué de citrate trisodique, de lysine, de glycine, d'arginine et l'isoleucine, ajusté à un pH de 7,5.

L'éluat ainsi récupéré constitue la fraction plasmatique utilisée pour la
25 nanofiltration. Dans le procédé selon l'invention, l'étape de chromatographie est effectuée par chromatographie d'affinité, mixed-mode ou échangeuse d'ions.

[0030] Dans un mode de réalisation particulier, la purification chromatographique est une chromatographie échangeuse d'ions. De préférence, elle est effectuée sur une matrice échangeuse d'ions à base de polymère naturel ou synthétique, résine
30 ou gel, sur laquelle sont greffés des groupements échangeurs d'anions de type base faible, de préférence le DEAE. De préférence, la purification chromatographique comprend une première étape de chargement d'une

composition de fibrinogène, notamment de la fraction plasmatique solubilisée, sur un échangeur d'anions de type base faible, ledit échangeur étant préalablement équilibré par un tampon de force ionique prédéterminée de pH basique. Ledit tampon est appelé tampon d'équilibrage.

- 5 **[0031]** Dans le procédé selon l'invention, le tampon d'élution comprend de l'arginine en arginine est préférentiellement d'au moins 200 mM, au moins 300 mM, au moins 400 mM, au moins 500mM, au moins 600 mM, au moins 700 mM, au moins 800 mM, au moins 900 mM, au moins 1M.

- [0032]** Dans un mode de réalisation préféré, la concentration en arginine du
10 tampon d'élution est préférentiellement comprise entre 200 et 800 mM, entre 200 et 700 mM, entre 200 et 600 mM, entre 200 et 500 mM, entre 200 et 400 mM, entre 200 et 300 mM.

- [0033]** Dans un autre mode de réalisation, la concentration en arginine du tampon d'élution est préférentiellement comprise entre 300 et 800 mM, entre 400
15 et 800 mM, entre 500 et 800 mM, entre 600 et 800 mM, entre 700 et 800 mM.

[0034] Dans un autre mode de réalisation, la concentration en arginine du tampon d'élution est préférentiellement comprise entre 300 et 800 mM, entre 400 et 700 mM, entre 400 et 600 mM.

- [0035]** Dans le procédé selon l'invention, le tampon d'élution peut également
20 contenir d'autres excipients adaptés, tels que des sels et/ou des acides aminés par exemple du citrate trisodique, du Tris, de la lysine, de la glycine, et/ou de l'isoleucine. La concentration en protéines dans l'éluat est de l'ordre de 2 à 5 g/l.

- [0036]** Dans un mode de réalisation particulier, la purification chromatographique est une chromatographie d'affinité. De préférence, la purification
25 chromatographique comprend une première étape de chargement d'une composition de fibrinogène, issue du cryosurnageant ou du cryoprécipité remis en suspension, sur une résine d'affinité, ladite résine étant préalablement équilibrée par un tampon de force ionique prédéterminée de pH adapté. Ledit tampon est appelé tampon d'équilibrage.

- 30 **[0037]** Ainsi, de préférence, lors de l'étape a), la fraction plasmatique solubilisée est chargée sur toute matrice d'affinité, résine ou gel, sur laquelle sont greffés des

ligands chimiques ou synthétique tels que les anticorps, les fragments d'anticorps, les dérivés d'anticorps ou des ligands chimiques tels que des peptides, des peptides mimétiques, des peptoides, des nanofitines ou encore des ligands oligonucléotidiques tels que les aptamères. Dans un mode de réalisation
5 particulier, le support chromatographique est disponible sous l'appellation CaptureSelect Fibrinogen (Life Technologies). Dans un autre mode de réalisation particulier, le support chromatographique est obtenu selon la méthode décrite dans la demande WO2018007530.

[0038] Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, la fraction
10 plasmatique soumise au procédé de l'invention peut ainsi être obtenue selon le procédé décrit par la Demanderesse dans la demande WO2015/136217 ou la demande WO2018007530.

[0039] De façon avantageuse la chromatographie d'affinité peut être réalisée en chromatographie continue de type SMB (Simulated Moving Bed) par exemple
15 avec la technologie NOVASEP SMCC (Sequential MultiColumns Chromatography). En utilisant entre 2 et 8 colonnes de petite taille réalisant plusieurs cycles de purification de manière à purifier l'ensemble du fibrinogène, la taille des colonnes et des équipements de chromatographie se trouve réduite de façon importante (de l'ordre de 10 fois). De plus en surchargeant la résine
20 d'affinité lors de phases de chargement du fibrinogène le besoin en résine par lot de fibrinogène peut être réduit de 10 à 50% en général. Les éluats générés en chromatographie continue peuvent être soit utilisés en continu pour les étapes suivantes avec ou sans concentration en ligne en utilisant des équipements de concentration en ligne de type Cadence Pall ou équivalent d'autres fournisseurs.
25 Une variante consiste à pooler les éluats avant la suite du procédé, avec une reconcentration possible des éluats avant leur utilisation.

[0040] Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, la chromatographie d'affinité est réalisée sur la solution de fibrinogène ayant subi le traitement d'inactivation virale, ainsi la solution d'inactivation virale se retrouve
30 dans la fraction non adsorbée de chromatographie et est éliminée en même temps que le fibrinogène est purifié.

[0041] Dans le procédé selon l'invention, le tampon d'élution comprend de l'arginine; la concentration en arginine est préférentiellement d'au moins 200 mM au moins 300 mM, au moins 400 mM, au moins 500 mM, au moins 600 mM, au moins 700 mM, au moins 800 mM, au moins 900 mM, au moins 1M.

- 5 **[0042]** Dans un mode de réalisation préféré, la concentration en arginine du tampon d'élution est préférentiellement comprise entre 200 et 800mM, entre 200 et 700 mM, entre 200 et 600 mM, entre 200 et 500 mM, entre 200 et 400 mM, entre 200 et 300 mM.

- [0043]** Dans un autre mode de réalisation, la concentration en arginine du
10 tampon d'élution est préférentiellement comprise entre 300 et 800 mM, entre 400 et 800 mM, entre 500 et 800 mM, entre 600 et 800 mM, entre 700 et 800 mM.

[0044] Dans un autre mode de réalisation, la concentration en arginine du tampon d'élution est préférentiellement comprise entre 300 et 800 mM, entre 400 et 700 mM, entre 400 et 600 mM.

- 15 **[0045]** Dans le procédé selon l'invention, le tampon d'élution peut également contenir d'autres excipients adaptés, tels que des sels et/ou des acides aminés par exemple du citrate trisodique, du Tris, de la lysine, de la glycine, et/ou de l'isoleucine.

- [0046]** Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le tampon
20 d'élution peut consister soit en une modification du pH et/ou de la force ionique.

[0047] Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, la composition comprenant du fibrinogène provient de lait d'animaux transgéniques, par exemple obtenu selon la méthode décrite dans WO00/17234 ou dans WO00/17239.

- [0048]** De manière avantageuse, la composition de fibrinogène soumise au
25 procédé selon l'invention possède une pureté supérieure ou égale à 70%, de manière préférée supérieure ou égale à 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

- [0049]** Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention ne comprend avantageusement
30 pas d'autres protéines co-purifiées, avantageusement pas de FXIII et/ou de

fibronectine et/ou de prothrombine (FII) et/ou de thrombine, et/ou de plasminogène et/ou de plasmine. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention est avantageusement dépourvue de FXIII.

- 5 **[0050]** Selon l'invention, la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention peut également comprendre une ou plusieurs protéines accompagnantes, éventuellement co-purifiées. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention comprend avantageusement du FXIII.
- 10 **[0051]** Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention ne comprend pas de formes multimériques de fibrinogène, avantageusement pas de polymères de fibrinogène ni d'agrégats de fibrinogène.

- [0052]** De manière particulièrement avantageuse, la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention est concentrée à plus de 1g de fibrinogène/L de solution, de préférence à plus de 2g de fibrinogène/L de solution, de manière encore plus préférée à plus de 3g de fibrinogène/L de solution, à plus de 3,5g de fibrinogène/L de solution, à plus de 4g de fibrinogène/L de solution, à plus de 4,5g de fibrinogène/L de solution. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention,
- 15
- 20 la composition de fibrinogène soumise au procédé selon l'invention est concentrée entre 2g et 5g de fibrinogène/L de solution. En outre, de préférence, elle est utilisée sans dilution préalable. En effet, de préférence, le procédé selon l'invention ne nécessite pas d'étape de dilution préalable de la composition de fibrinogène.

- 25 **[0053]** Le procédé selon l'invention comprend optionnellement une étape b), selon laquelle au moins une étape de filtration du fibrinogène, est réalisée sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08µm et 0,22µm.

- [0054]** De préférence, l'étape b) comprend deux étapes de filtration du fibrinogène sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08µm et 0,22µm.
- 30 De préférence, la première filtration est effectuée sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,15µm et 0,22µm, de préférence d'environ 0,2 µm. De

préférence, la seconde filtration est effectuée sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08µm et 0,15µm, de préférence d'environ 0,1 µm.

- [0055]** Ces filtrations peuvent être réalisées en utilisant les filtres de polyéthersulfone (PES) commercialisés par Sartorius sous le nom Sartopore® 2
5 Maxicaps® ou tout autre média équivalent ayant des caractéristiques similaires.

[0056] De préférence, la séquence de filtres est, préalablement à l'étape b), équilibrée avec le tampon des étapes préalables de purification, en particulier avec le tampon d'élution de la chromatographie éventuellement supplémenté en acides aminés.

- 10 **[0057]** A la fin de l'étape b), on récupère une composition de fibrinogène.

[0058] Puis, le procédé selon l'invention comprend la filtration de la composition de fibrinogène optionnellement obtenue en b), sur filtre symétrique ayant une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm : c'est l'étape c).

- [0059]** Si l'étape b) est effectuée, alors la solution de fibrinogène obtenue en b)
15 est passée sur filtre symétrique ayant des pores de diamètre compris entre 15 nm et 25 nm, préférentiellement de 20 nm, et la solution résultante de fibrinogène est récupérée. Si l'étape b) n'est pas effectuée, alors la composition de fibrinogène obtenue par élution de chromatographie à l'étape a) est directement passée sur filtre symétrique ayant des pores de diamètre compris entre 15 nm et 25 nm,
20 préférentiellement de 20 nm, et la solution résultante de fibrinogène est récupérée.

[0060] La nanofiltration de l'étape c) est typiquement réalisée à une pression comprise entre 200 et 4000 mbar. De manière avantageuse, la nanofiltration de l'étape b) est typiquement réalisée à une pression comprise entre 200 et 1000 mbar, ou entre 2000 et 4000 mbar.

- 25 **[0061]** De manière avantageuse, les filtres utilisés peuvent être définis par leur taille moyenne de pores en nm, par les virus retenus par le filtre, par un seuil de poids moléculaire ou par le type de symétrie de leur membrane. Les filtres utilisés peuvent donc être des filtres ou tout autre filtre équivalent commercialisé :

- définis par une taille moyenne de pores en nm, incluant les filtres de la gamme
30 Planova®, constitués d'une membrane à fibres creuses formée de cellulose régénérée au cuprammonium et commercialisés par Asahi-Kasei (Planova® 15N,

- Planova® 20N), et ceux de la gamme Ultipor®, composés d'une membrane de polyfluorure de vinylidène modifié à la surface et sont commercialisés par Pall (Ultipor DV20, Pegasus SV4), ou tout autre filtre équivalent commercialisé ;
- dont la taille moyenne des pores est définie relativement aux virus retenus par le
- 5 filtre. La taille moyenne des pores du filtre correspond alors à la taille du plus petit virus retenu par le filtre. De tels filtres, définis par les virus retenus par le filtre, incluent les filtres Planova BioEX en PVDF (rétention des parvovirus, membrane en polyvinylidène fluoride hydrophile modifié) commercialisés par la société Asahi Kasei Bioprocess, les filtres Pegasus SV4, ou Ultipor VF (rétention des parvovirus,
- 10 membrane en polyvinylidène fluoride hydrophile modifié) commercialisés par Pall, les filtres Viresolve® NFP (rétention des parvovirus, membrane en polyfluorure de vinylidène modifié en surface), Viresolve Pro (rétention des parvovirus, membrane en polyéthersulfone double couche) et Viresolve® NFR (rétention des rétrovirus, membrane en polyéthersulfone) commercialisés par Millipore, et Virosart® CPV
- 15 (rétention du parvovirus canin, membrane à double couche de polyéthersulfone), Virosart HC ou Virosart HF commercialisé par Sartorius, ou tout autre filtre équivalent commercialisé. Ces filtres, qui sont définis par les virus retenus, notamment les parvovirus, présentent une taille moyenne de pores d'environ 20 nm.
- 20 - définis par leur symétrie, par exemple
- filtres asymétriques tels que les filtres de la gamme Planova®, commercialisés par Asahi-Kasei (Planova® 15N, Planova® 20N, Planova BioEx), Viresolve NFP et Viresolve Pro (commercialisés par Merck Millipore), Virosart HF (commercialisé par Sartorius Stedim).
- 25 filtres symétriques, tel que le filtre Pegasus SV4 ou Ultipor DV20 (commercialisés par Pall), le filtre Virosart CPV (commercialisé par Sartorius Stedim).
- Une telle classification des filtres selon leur symétrie apparait notamment dans Gustafsson et al., « Mille-feuille paper : a novel type of filter architecture for advanced virus separation applications ». Materials Horizons 2016, 3, 320-337.
- 30 **[0062]** Par « filtre symétrique » selon l'invention on entend un filtre ayant une porosité équivalente entre la surface interne (en contact avec la solution à filtrer)

et externe du filtre. Ceci vient en opposition des filtres asymétriques pour lesquels la surface interne du filtre est souvent plus poreuse que la surface externe.

[0063] Quelle que soit la manière dont est défini le filtre par le fabricant, la taille des pores en nm peut être mesurée par l'homme du métier selon des techniques
5 connues.

[0064] Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, la nanofiltration réalisée à l'étape c) est effectuée à l'aide d'un filtre de type symétrique.

[0065] De préférence, la nanofiltration de l'étape c) est effectuée en utilisant un filtre symétrique, tel que le filtre Pegasus SV4 ou Ultipor DV20 (commercialisés
10 par Pall), le filtre Virosart CPV (commercialisé par Sartorius Stedim).

[0066] Dans un mode de réalisation particulier, le filtre symétrique est en montage plissé.

[0067] Dans un autre mode de réalisation particulier le filtre symétrique est avantageusement caractérisé par une membrane polyvinylidène difluoride (PVDF)
15 hydrophile.

[0068] Dans un mode de réalisation particulier, le filtre symétrique en montage plissé caractérisé par une membrane polyvinylidène difluoride (PVDF) hydrophile est un filtre Pegasus SV4 (commercialisé par Pall).

[0069] La Demanderesse a avantageusement mis en évidence que les filtres de
20 type symétrique, tels que des filtres similaires au filtre Pegasus SV4 ou Ultipor DV20 (commercialisés par Pall) ou Virosart CPV (commercialisé par Sartorius Stedim) permettaient de réaliser la nanofiltration du fibrinogène avec une charge d'au moins 0,2 kg de fibrinogène/m² de membrane et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement congelée et/ou décongelée et d'obtenir de
25 meilleurs résultats qu'avec un filtre de type asymétrique tels que les filtres de la gamme Planova®, commercialisés par Asahi-Kasei (Planova® 15N, Planova® 20N).

[0070] Comme cela est montré en exemples, cette étape c) permet de filtrer un volume conséquent de solution de fibrinogène, avec un très bon rendement, i.e.

au moins égal à 90%. Ce volume conséquent correspond à une capacité d'au moins 0,2 kg de fibrinogène par m² et peut aller jusqu'à au moins 5 kg par m².

[0071] Comme cela est montré dans l'exemple 7, la capacité de filtration d'une composition de fibrinogène est avantageusement augmentée en ajoutant des concentrations croissantes d'arginine dans le tampon d'élution de la chromatographie réalisée préalablement à la séquence de filtration.

[0072] Dans un mode de réalisation préféré du procédé de filtration selon l'invention, le tampon d'élution de la chromatographie réalisée à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 200 mM et ledit procédé de filtration a une capacité d'au moins 0.25 kg/m².

[0073] Dans un autre mode réalisation du procédé de filtration selon l'invention, le tampon d'élution de la chromatographie réalisée à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 200 mM et ledit procédé de filtration a une capacité d'au moins 0.30 kg/m²

[0074] Dans un autre mode de réalisation, le tampon d'élution de la chromatographie réalisée à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 200 mM et ledit procédé de filtration a une capacité d'au moins 0.35 kg/m².

[0075] Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le tampon d'élution de la chromatographie réalisée à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 400 mM et ledit procédé de filtration a une capacité d'au moins 0.25 kg/m²

[0076] Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le tampon d'élution de la chromatographie réalisée à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 400 mM et ledit procédé de filtration a une capacité d'au moins 0.30 kg/m². Dans un autre mode de réalisation, le tampon d'élution de la chromatographie réalisée à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 400 mM et ledit procédé de filtration a une capacité d'au moins 0.35 kg/m².

[0077] La capacité de filtration est mesurée par toute méthode connue de l'homme du métier. Typiquement, celle-ci est déterminée de la manière suivante :

La solution de fibrinogène à nanofiltrer est prépurifiée par chromatographie selon la méthode décrite dans EP1739093. La concentration de la solution de fibrinogène de départ est de 3g/L.

En vue de déterminer la capacité de filtration, des quantités croissantes de fibrinogène sont appliquées sur la séquence de nanofiltration.

Une séquence de filtration de cet éluat est appliquée :

- Filtre 0.2-0.1 μm polyéthersulfone
- Filtre 35 nm (de type Planova 35 N, de la société Asahi)
- Filtre symétrique 20 nm (de type Pegasus SV4 de la société Pall Life Sciences)

La filtration est réalisée à une pression constante de 2.1 bar sur le filtre 20 nm.

La capacité de filtration du filtre est déterminée par l'analyse du profil de colmatage; la capacité de filtration maximale correspond à la quantité de fibrinogène associée à un débit de filtration inférieur à 25% du débit initial.

[0078] On pourra également citer la méthode décrite par Burnouf et al (Haemophilia. 2003 Jan;9(1):24-37).

[0079] De préférence, le procédé de filtration d'une composition de fibrinogène selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- A) obtention de la composition de fibrinogène, ladite composition de fibrinogène étant choisie parmi un surnageant de culture cellulaire, du lait d'animaux transgéniques, le surnageant de plasma cryoprécipité, le cryoprécipité de plasma remis en suspension, la fraction I obtenues par fractionnement éthanolique selon la méthode de Cohn ou de Kistler & Nitschmann, le surnageant et le précipité obtenus après précipitation d'une fraction plasmatique à l'hydroxyde d'aluminium et/ou une précipitation à basse température, et les éluats de chromatographies et les fractions non adsorbées des colonnes de chromatographie obtenus à partir d'une fraction plasmatique, d'un surnageant de culture cellulaire ou d'un lait d'animaux transgéniques,
- a) passage de la composition obtenue en A) sur une chromatographie d'affinité, mixed-mode ou d'échange d'ions et élution en tampon comprenant de l'arginine
 - b) au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène obtenue en a), sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08 μm et 0,22 μm ,
 - c) filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b), sur filtre symétrique ayant

une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, et
d) récupération de la solution résultante de fibrinogène,
ledit procédé de filtration étant réalisé, sans ajout d'arginine après l'étape a), à
capacité élevée et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement
5 congelée et/ou décongelée.

[0080] De manière préférée, le procédé de filtration d'une composition de
fibrinogène selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- A) obtention d'un surnageant de plasma cryoprécipité ou d'un cryoprécipité de
plasma remis en suspension,
- 10 a) passage de la composition obtenue en A) sur une chromatographie d'affinité,
de préférence une chromatographie d'affinité à ligands aptamères, et élution en
tampon comprenant de l'arginine
b) au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène obtenue en a),
sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08 μm et 0,22 μm ,
- 15 c) filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b), sur filtre symétrique ayant
une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, et
d) récupération de la solution résultante de fibrinogène,
ledit procédé de filtration étant réalisé sans ajout d'arginine après l'étape a), à
capacité élevée et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement
20 congelée et/ou décongelée.

[0081] Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la solution de
fibrinogène obtenue optionnellement en b) est passée sur filtre ayant des pores de
diamètre compris entre 15 nm et 50 nm préalablement à l'étape c) : c'est l'étape
b').

- 25 **[0082]** De manière avantageuse, les filtres utilisés peuvent être définis par leur
taille moyenne de pores en nm, par les virus retenus par le filtre, par un seuil de
poids moléculaire ou par le type de symétrie de leur membrane. Les filtres utilisés
peuvent donc être des filtres ou tout autre filtre équivalent commercialisé :
- définis par une taille moyenne de pores en nm, incluant les filtres de la gamme
- 30 Planova®, constitués d'une membrane à fibres creuses formée de cellulose
régénérée au cuprammonium et commercialisés par Asahi-Kasei (Planova® 15N,
Planova® 20N), et ceux de la gamme Ultipor®, composés d'une membrane de

polyfluorure de vinylidène modifié à la surface et sont commercialisés par Pall (Ultipor DV20, Pegasus SV4), ou tout autre filtre équivalent commercialisé ;

- dont la taille moyenne des pores est définie relativement aux virus retenus par le filtre. La taille moyenne des pores du filtre correspond alors à la taille du plus petit virus retenu par le filtre. De tels filtres, définis par les virus retenus par le filtre, incluent les filtres Planova BioEX en PVDF (rétention des parvovirus, membrane en polyvinylidène fluoride hydrophile modifié) commercialisés par la société Asahi Kasei Bioprocess, les filtres Pegasus SV4, ou Ultipor VF (rétention des parvovirus, membrane en polyvinylidène fluoride hydrophile modifié) commercialisés par Pall, les filtres Viresolve® NFP (rétention des parvovirus, membrane en polyfluorure de vinylidène modifié en surface), Viresolve Pro (rétention des parvovirus, membrane en polyéthersulfone double couche) et Viresolve® NFR (rétention des rétrovirus, membrane en polyéthersulfone) commercialisés par Millipore, et Virosart® CPV (rétention du parvovirus canin, membrane à double couche de polyéthersulfone), Virosart HC ou Virosart HF commercialisé par Sartorius, ou tout autre filtre équivalent commercialisé. Ces filtres, qui sont définis par les virus retenus, notamment les parvovirus, présentent une taille moyenne de pores d'environ 20 nm.

- définis par leur symétrie, par exemple

- filtres asymétriques tels que les filtres de la gamme Planova®, commercialisés par Asahi-Kasei (Planova® 15N, Planova® 20N, Planova BioEx), Viresolve NFP et Viresolve Pro (commercialisés par Merck Millipore), Virosart HF (commercialisé par Sartorius Stedim).

- filtres symétriques, tel que le filtre Pegasus SV4 ou Ultipor DV20 (commercialisés par Pall), le filtre Virosart CPV (commercialisé par Sartorius Stedim).

Une telle classification des filtres selon leur symétrie apparaît notamment dans Gustafsson et al., « Mille-feuille paper : a novel type of filter architecture for advanced virus separation applications ». Materials Horizons 2016, 3, 320-337.

- [0083]** Par « filtre symétrique » selon l'invention on entend un filtre ayant une porosité équivalente entre la surface interne (en contact avec la solution à filtrer) et externe du filtre.

[0084] Selon un mode particulier de mise en œuvre du procédé, la nanofiltration de l'étape b') est effectuée en utilisant des filtres ayant des pores de diamètre compris entre 25 nm et 50 nm, préférentiellement de 35 nm. De préférence, la nanofiltration de l'étape b') est alors effectuée en utilisant le filtre Planova 35 N commercialisé par Asahi Kasei Bioprocess ou STyLUX par Meissner (40 nm).

[0085] Alternativement, la nanofiltration de l'étape b') est effectuée en utilisant des filtres symétriques ayant des pores de diamètre compris entre 15 nm et 25 nm, préférentiellement de 20 nm. De préférence, la nanofiltration de l'étape b') est alors effectuée en utilisant un filtre à membrane symétrique, tel que le filtre Pegasus SV4 ou Ultipor DV20 (commercialisés par Pall) ou Virosart CPV (commercialisé par Sartorius Stedim).

[0086] Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la nanofiltration de l'étape b') et de l'étape c) est réalisée sur des filtres de porosité décroissante, avantageusement sur un filtre de porosité 35 nm suivi d'un filtre symétrique de porosité 20 nm. De préférence, la nanofiltration de l'étape b') est alors effectuée en utilisant le filtre Planova 35 N commercialisé par Asahi Kasei Bioprocess puis un filtre à membrane symétrique, tel que le filtre Pegasus SV4 ou Ultipor DV20 (commercialisés par Pall) ou Virosart CPV (commercialisé par Sartorius Stedim).

[0087] Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, la nanofiltration de l'étape b') et de l'étape c) est réalisée sur des filtres de même taille de pores, avantageusement sur 2 filtres identiques. De préférence, la nanofiltration de l'étape b') est alors effectuée en utilisant un filtre à membrane symétrique, tel que le filtre Pegasus SV4 ou Ultipor DV20 (commercialisés par Pall) ou Virosart CPV (commercialisé par Sartorius Stedim).

[0088] La nanofiltration de l'étape b') est typiquement réalisée à une pression comprise entre 200 et 4000 mbar. De manière avantageuse, la nanofiltration de l'étape b') est typiquement réalisée à une pression comprise entre 200 et 1000 mbar, ou entre 2000 et 4000 mbar.

[0089] Ainsi, de préférence, l'invention concerne un procédé de filtration d'une composition de fibrinogène, comprenant les étapes suivantes:
a) purification par chromatographie de la composition de fibrinogène à l'aide d'un

tampon d'élution comprenant de l'arginine :

- b) au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène, sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08µm et 0,22µm, et récupération de la solution résultante de fibrinogène,
 - 5 b') filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b), sur filtre ayant des pores de diamètre compris entre 15 nm et 50 nm,
 - c) filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b'), sur filtre symétrique ayant une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, et
 - d) récupération de la solution résultante de fibrinogène.
- 10 ledit procédé de filtration étant réalisé sans ajout d'arginine après l'étape a), à capacité élevée et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement congelée et/ou décongelée.

[0090] A la fin de l'étape d), la solution obtenue comprend du fibrinogène, et est hautement sécurisée.

- 15 **[0091]** De manière particulièrement avantageuse, la mise en œuvre de l'étape c) du procédé selon l'invention permet l'élimination d'au moins 2log, avantageusement d'au moins 3log, encore plus avantageusement au moins 4log, préférentiellement au moins 5 log ou au moins 6log de virus de petites tailles tel que le parvovirus B19.

- 20 **[0092]** De préférence, le procédé de filtration d'une composition de fibrinogène selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- A) obtention de la composition de fibrinogène, ladite composition de fibrinogène étant choisie parmi un surnageant de culture cellulaire, du lait d'animaux transgéniques, le surnageant de plasma cryoprécipité, le cryoprécipité de plasma
- 25 remis en suspension, la fraction I obtenues par fractionnement éthanolique selon la méthode de Cohn ou de Kistler & Nitschmann, le surnageant et le précipité obtenus après précipitation d'une fraction plasmatique à l'hydroxyde d'aluminium et/ou une précipitation à basse température, et les éluats de chromatographies et les fractions non adsorbées des colonnes de chromatographie obtenus à partir
- 30 d'une fraction plasmatique, d'un surnageant de culture cellulaire ou d'un lait d'animaux transgéniques,
- a) passage de la composition obtenue en A) sur une chromatographie d'affinité,

- mixed-mode ou d'échange d'ions et élution en tampon comprenant de l'arginine,
b) au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène obtenue en A),
sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08 μm et 0,22 μm ,
b') filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b), sur filtre ayant des pores
5 de diamètre compris entre 15 nm et 50 nm,
c) filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b'), sur filtre symétrique ayant
une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, et
d) récupération de la solution résultante de fibrinogène,
ledit procédé de filtration étant réalisé sans ajout d'arginine après l'étape a), à
10 capacité élevée et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement
congelée et/ou décongelée.

[0093] De manière préférée, le procédé de filtration d'une composition de fibrinogène selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- A) obtention d'un surnageant de plasma cryoprécipité ou d'un cryoprécipité de
15 plasma remis en suspension,
a) passage de la composition obtenue en A) sur une chromatographie d'affinité,
de préférence une chromatographie d'affinité à ligands aptamères, et élution en
tampon comprenant de l'arginine
b) au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène obtenue en a),
20 sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08 μm et 0,22 μm ,
c) filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b), sur filtre symétrique ayant
une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, et
d) récupération de la solution résultante de fibrinogène,
ledit procédé de filtration étant réalisé sans ajout d'arginine après l'étape a), à
25 capacité élevée et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement
congelée et/ou décongelée.

- [0094]** La solution obtenue à l'étape d) peut ensuite être concentrée, par exemple
par ultrafiltration, jusqu'à des teneurs typiquement comprises entre 10 et 40,
préférentiellement entre 15 et 25 g de protéines totales/l, déterminées par des
30 mesures classiques connues de l'homme du métier.

[0095] En outre, la solution de fibrinogène obtenue, éventuellement concentrée,
peut être soumise à une étape de diafiltration. Cette étape est destinée à éliminer
l'excès éventuel de sel inorganique utilisé pour obtenir des solutions ayant une

force ionique d'au plus 0,2 M. Cette étape peut également se révéler nécessaire afin de formuler le fibrinogène dans des conditions optimales. Le tampon est avantageusement adapté soit pour une conservation de la composition de fibrinogène sous forme liquide (formulation liquide prête à l'emploi) soit pour une conservation sous forme lyophilisée (formulation adaptée à la préservation lors de l'étape de lyophilisation et éventuellement à l'étape de chauffage à sec). Cela permet dans ce cas d'une part, un chauffage à sec du fibrinogène sans risque de dénaturation, et, d'autre part, une solubilisation rapide lorsque le fibrinogène est lyophilisé par la suite, typiquement en 3 à 8 minutes.

- 5 [0096] Les solutions respectives, éventuellement diafiltrées, éventuellement concentrées, peuvent être éventuellement lyophilisées selon des méthodes classiques et conditions habituelles. Les lyophilisats peuvent ensuite être reconstitués dans un milieu aqueux compatible avec un usage clinique, de préférence dans de l'eau purifiée pour injection (PPI), et directement injectés par
- 15 voie intraveineuse.

[0097] Il peut en outre être prévu au moins une étape additionnelle d'élimination ou d'inactivation d'au moins un agent infectieux et des contaminants, comme les virus, les bactéries ou les ATNC (agents transmissibles non conventionnels) comme le prion.

- 20 [0098] Une inactivation virale comprend souvent un traitement avec des produits chimiques, par exemple par solvant et/ou détergent et/ou par la chaleur (pasteurisation et/ou chauffage à sec) et/ou par irradiation (rayons gamma et/ou UVC) Cette étape peut être effectuée par un traitement chimique classique d'inactivation virale, de préférence consistant en un traitement par solvant-
- 25 détergent (appelé généralement traitement S/D). Les agents chimiques d'inactivation virale sont préférentiellement les mélanges de polysorbate et de Tri(n-butyl)phosphate (TnBP), ou les mélanges de Triton (octoxynol) et de TnBP, dont les concentrations typiques sont comprises entre 0,1 et 2% . Cette inactivation virale peut être intégrée à un stade quelconque du procédé, mais elle
- 30 est judicieusement mise en œuvre avant l'étape a) de purification chromatographique. De cette façon, celle-ci contribuera à l'élimination efficace des agents d'inactivation.

[0099] Alternativement, on peut utiliser une étape additionnelle de traitement thermique d'inactivation virale à sec, effectuée sur les lyophilisats de fibrinogène obtenus après l'étape de lyophilisation. Les conditions opératoires sont classiquement d'environ 80°C pendant 72 heures.

- 5 [0100] L'élimination des agents infectieux peut également être réalisée au moyen d'une filtration en profondeur. Les filtres disponibles sont par exemple des filtres composés de cellulose régénérée, dans lesquels des adjuvants de filtration peuvent avoir été additionnés, tels que la cellite, la perlite ou des terres de Kieselguhr. De tels filtres sont notamment commercialisés par Cuno (filtres Zeta+
10 VR series), Pall-Seitz (P-series Depth Filter) ou Sartorius Sartoclear P depth filters).

[0101] Ainsi, la mise en œuvre du procédé conduit à des solutions de fibrinogène hautement sécurisées, exempte de particules virales et/ou de contaminants de type ATNC.

- 15 [0102] L'invention a donc pour objet une solution de fibrinogène susceptible d'être obtenue par le procédé décrit ci-dessus.

[0103] La solution de fibrinogène susceptible d'être obtenue par le procédé décrit ci-dessus présente avantageusement une pureté supérieure ou égale à 95% et est avantageusement stable sans addition de protéine stabilisante telle que
20 l'albumine.

[0104] La solution de fibrinogène susceptible d'être obtenue par le procédé décrit ci-dessus présente avantageusement une activité fibrinogène intègre avec en particulier un ratio fibrinogène coagulable / fibrinogène antigénique > 0,9, voire égal à 1,0.

- 25 [0105] Les exemples qui suivent illustrent un mode de réalisation de la présente invention sans toutefois en limiter la portée.

[0106]

Exemples

- 30 [0107] **Exemple 1 : Evaluation de la filtration du fibrinogène sur filtre symétrique 20 nm selon l'invention**

[0108] La composition comprenant du fibrinogène prépurifié est obtenue selon la méthode décrite dans la demande EP1739093.

[0109] I – Objectifs

Evaluer la filtrabilité d'une composition comprenant du fibrinogène sur un filtre symétrique de nanofiltration de taille de pores d'environ 20nm.

[0110] II – Paramètres opératoires**5 Séquence de filtration**

- Filtre 0,2 - 0,1 µm polyéthersulfone (PES)

- Filtre symétrique 20 nm Pégasus SV4 de la société Pall Life Sciences, surface 0,00096 m² (Pegasus VF SV4, 10MCF SV4, surface 9,6 cm²).

La solution comprenant le fibrinogène est concentrée à 3g/L et pure à plus de

10 90%

[0111] [Tableau 1]

Etapes / Paramètres	Evaluation filtre 20 nm
Matière première	Fibrinogène éluat de chromatographie obtenu selon EP1739093 élué en tampon comprenant 200 mM d'arginine
Séquence de filtration	0,2 - 0,1 µm PES 20 nm 0,00096 m ²
Protéines totales g/L	2,7
Pression mBar	2110 ± 10 (sur le filtre 20 nm)

[0112] III – Résultats

15 **[0113]** La pression de filtration a été maintenue constante à 2,1 Bar sur le filtre 20 nm durant toute la filtration.

[0114] La séquence de filtration est équilibrée en tampon d'élution de la chromatographie échangeuse d'ions décrite dans le brevet EP1739093 comprenant de l'arginine. Le profil de colmatage du fibrinogène sur le filtre de taille de pores 20 nm est linéaire avec une décroissance proportionnelle au volume filtré jusqu'à 181 L/m².

20 **[0115]** Après 10 heures 15 minutes de filtration correspondant à une utilisation optimale du filtre, un poids de 178 g de solution a été collecté ; à ce stade, le ratio du débit de filtration / débit initial est de 19%. Le débit moyen de filtration calculé de 0,3 g/min correspond à environ 17 L/h/m² de membrane.

[0116] IV – Tableau récapitulatif des résultats**[0117] [Tableau 2]**

Etapes / Paramètres	Résultats
Durée de filtration	10 h 15
Capacité de la séquence kg/m²	185
Ratio débit final / initial %	19
Débit moyen kg/h/m²	18
Fibrinogène antigénique g/L	ND
Capacité de la séquence kg de protéine / m²	0,5

[0118] La séquence de filtration appliquée a permis de filtrer une quantité équivalente à 0,5kg de fibrinogène par m² de membrane de taille de pores 20 nm en 6 heures. Des filtrabilités plus importantes auraient pu être atteintes en prolongeant la durée de filtration.

[0119] Grâce au procédé selon l'invention, le rendement de cette nanofiltration est supérieur à 90%.

[0120] Le procédé selon l'invention permet donc la filtrabilité, sur filtre symétrique de taille de pores d'environ 20 nm, d'une composition comprenant du fibrinogène sans étape de congélation/décongélation préalable, ni dilution préalable à partir d'une solution de fibrinogène pré-purifié par chromatographie et éluée par tampon comprenant de l'arginine.

[0121] Exemple 2 : Evaluation de la filtration du fibrinogène sur filtre symétrique 20 nm Pall DV 20 selon l'invention

[0122] La composition comprenant du fibrinogène prépurifié est obtenue selon la méthode décrite dans la demande EP1739093.

[0123] I – Objectifs

Evaluer la filtrabilité d'une composition comprenant du fibrinogène sur un filtre symétrique de nanofiltration de taille de pores d'environ 20nm.

[0124] II – Paramètres opératoires

Séquence de filtration

- Filtre 0,2 - 0,1 μm polyéthersulfone (PES)
 - Filtre symétrique 20 nm ULTIPOR VF DV20 de la société Pall Life Sciences,
- 5 surface 0,00106 m².

[0125] La solution comprenant le fibrinogène est concentrée à 3,1 g/L et pure à plus de 90%

[0126] [Tableau 3]

Etapes / Paramètres	Evaluation filtre 20 nm
Matière première	Fibrinogène éluat de chromatographie obtenu selon EP1739093 élué en tampon comprenant 200 mM d'arginine
Séquence de filtration	0,2 - 0,1 μm PES 20 nm 0,00106 m ²
Protéines totales g/L	3,1
Pression mBar	2 027 $\pm$ 7 (sur le filtre 0,2 - 0,1 μm) 2 025 $\pm$ 39 (sur le filtre 20 nm)

10 **[0127]** III – Résultats

[0128] La pression de filtration a été maintenue constante à 2,0 Bar sur le filtre 20 nm durant toute la filtration.

[0129] La séquence de filtration est équilibrée en tampon d'élution de la chromatographie échangeuse d'ions décrite dans le brevet EP1739093

15 comprenant de l'arginine. Le profil de colmatage du fibrinogène sur le filtre de taille de pores 20 nm est linéaire avec une décroissance proportionnelle au volume filtré jusqu'à 136 L/m².

[0130] Après 16 heures 30 minutes de filtration correspondant à une utilisation optimale du filtre, un poids de 154,7 g de solution a été collecté ; à ce stade, le

20 ratio du débit de filtration / débit initial est de 27%. Le débit moyen de filtration calculé de 0,1 g/min correspond à environ 9 L/h/m² de membrane.

[0131] IV – Tableau récapitulatif des résultats

[0132] [Tableau 4]

Etapes / Paramètres	Résultats
Durée de filtration h	16 h 30
Capacité de la séquence kg/m²	146
Ratio débit final / initial %	27
Débit moyen kg/h/m²	8.8
Fibrinogène antigénique g/L	3,1
Capacité de la séquence kg de fibrinogène / m²	0,4

[0133] La séquence de filtration appliquée a permis de filtrer une quantité équivalente à 0,4 kg de fibrinogène par m² de membrane de taille de pores 20 nm en 15 heures. Des filtrabilités plus importantes auraient pu être atteintes en prolongeant la durée de filtration.

[0134] **Exemple 3 : Evaluation de la filtration du fibrinogène sur filtre symétrique 20 nm selon l'invention avec préfiltration 20-50 nm**

[0135] La composition comprenant du fibrinogène prépurifié est obtenue selon la méthode décrite dans la demande EP1739093.

[0136] I – Objectifs

Evaluer la filtrabilité d'une composition comprenant du fibrinogène sur un filtre symétrique de nanofiltration de taille de pores d'environ 20nm.

[0137] II – Paramètres opératoires

15 Séquence de filtration

- Filtre 0,2 - 0,1 µm polyéthersulfone (PES)
- Filtre 35 nm (Planova 35N d'Asahi)
- Filtre symétrique 20 nm Pégasus SV4 de la société Pall Life Sciences, surface 0,00096 m² (Pegasus VF SV4, 10MCFSV4, surface 9,6 cm²).

20 **[0138]** La solution comprenant le fibrinogène est concentrée à 3g/L et pure à plus de 90%

[0139] [Tableau 5]

Etapes / Paramètres	Evaluation filtre 20 nm
Matière première	Fibrinogène éluat de chromatographie obtenu selon EP1739093 élué en tampon comprenant 200 mM d'arginine
Séquence de filtration	0,2 - 0,1 µm PES 35 nm 0,01 m ² + 20 nm 0,00096 m ²
Protéines totales g/L	3,1
Pression mBar	300 ± 50 (sur le filtre 35 nm) 2100 ± 100 (sur le filtre 20 nm)

[0140] III – Résultats

[0141] La pression de filtration a été maintenue constante à 2,1 Bar sur le filtre 20 nm durant toute la filtration.

- 5 **[0142]** La séquence de filtration est équilibrée en tampon d'élution de la chromatographie échangeuse d'ions décrite dans le brevet EP1739093. Le profil de colmatage du fibrinogène sur le filtre de taille de pores 20 nm est linéaire avec une décroissance proportionnelle au volume filtré jusqu'à 276 L/m².

- 10 **[0143]** Après 18 heures de filtration correspondant à une utilisation optimale du filtre, un poids de 264,8 g de solution a été collecté ; à ce stade, le ratio du débit de filtration / débit initial est de 14%. Le débit moyen de filtration calculé de 0,3 g/min correspond à environ 15 L/h/m² de membrane.

[0144] IV – Tableau récapitulatif des résultats

[0145] [Tableau 6]

Etapes / Paramètres	Résultats
Durée de filtration h	18
Capacité de la séquence kg/m²	290
Ratio débit final / initial %	14
Débit moyen kg/h/m²	16,1
Fibrinogène antigénique g/L	3,0
Capacité de la séquence kg de fibrinogène / m²	0,8

[0146] La séquence de filtration appliquée a permis de filtrer une quantité équivalente à 0,8 kg de fibrinogène par m² de membrane de taille de pores 20 nm en 18 heures.

- 5 [0147] Grâce au procédé selon l'invention, le rendement de cette nanofiltration est supérieur à 90%.

[0148] Le procédé selon l'invention permet donc la filtrabilité, sur filtre symétrique de taille de pores d'environ 20 nm, d'une composition comprenant du fibrinogène sans étape de congélation/décongélation préalable, ni dilution préalable à partir
10 d'une solution de fibrinogène pré-purifié par chromatographie et éluée par tampon comprenant de l'arginine.

[0149] Exemple 4 : Comparaison du procédé selon l'invention avec un procédé de l'art antérieur sur filtre asymétrique d'environ 20nm

[0150] I – Objectifs

- 15 Comparer le niveau de capacité de fibrinogène par m² de membrane pouvant être supportée par le procédé selon l'invention et un procédé de l'art antérieur sur filtre asymétrique d'environ 20nm.

[0151] II – Préparation de la matière première :

- La composition comprenant du fibrinogène pré-purifié est obtenue selon la
20 méthode décrite dans la demande EP1739093. L'éluat de chromatographie obtenu selon EP1739093 est élué en tampon comprenant 200 mM d'arginine.

[0152] III – Préparation du tampon d'équilibrage du filtre

Il s'agit du même tampon d'élution que celui utilisé pour la préparation de l'éluât de départ (Tp E DEAE Macroprep, ajusté à pH 7,5 ± 0,1 par acide citrique 1M).

- 25 **[0153] IV – Séquence de filtration :**

1. Préfiltration :

La composition de fibrinogène est préfiltrée à l'aide d'un filtre PES (Polyéther sulfone) modèle Sartopore 2 de porosité 0,2 – 0,1 µm (100 nm).

2. Filtration :

- 30 Selon la condition opératoire testée la composition préfiltrée est alors filtrée :
à l'aide d'un filtre Pegasus SV4 (commercialisé par la société Pall Life Sciences) à

2100 ± 100 mbar, ou bien

à l'aide d'un filtre Planova 20N (commercialisé par la société Asahi) à 395 ± 23 mbar.

[0154] V – Résultats

- 5 Les résultats obtenus ont été compilés dans le graphique tel que représenté à la Figure 1.

[0155] Pour les deux procédés, on observe que plus le débit (en L/h/m²) appliqué est faible et plus la capacité en fibrinogène supportée (en g de fibrinogène par m² de membrane) augmente.

- 10 **[0156]** Cependant on observe que la capacité de fibrinogène supportée par le procédé de l'art antérieur (« procédé antérieur » dans le graphique ci-après) faisant ici appel à un filtre asymétrique Planova 20N d'Asahi est bien inférieure à celle supportée par le procédé selon l'invention (« procédé invention » dans le graphique ci-après), mettant ici en œuvre un filtre symétrique Pegasus SV4 de
15 Pall Life Sciences.

[0157] Ainsi ces résultats illustrent que l'application du procédé de l'art antérieur sur un filtre asymétrique ne permet pas d'obtenir une capacité de filtration de 200 g/m² de membrane, avec notamment une capacité de fibrinogène de 55 g/m² obtenue sur membrane Planova 20N Asahi.

- 20 **[0158] Exemple 5 : Comparaison du procédé selon l'invention sur filtre symétrique avec les procédés de l'art antérieur sur filtre asymétrique**

[0159] Dans les mêmes conditions que l'exemple 4, différents filtres asymétriques des procédés de l'art antérieur sont testés en comparaison avec le procédé selon l'invention.

- 25 **[0160]** Les résultats sont les suivants :

[0161] [Tableau 7]

	Procédé selon l'invention sur filtre symétrique			Procédé selon l'art antérieur sur filtres asymétriques			
	Pégasus S4 Pall (exemple 1)	Ultipor VF DV20 all (exemple 2)	Planov 35N Asahi + Pall SV4 (exemple 3)	Planova 20N Asahi (exemple 4)	Planova BioEx Asahi	Viresolve NFP Millipore	Vinosart HF Sartorius
Durée de filtration h	10h15	16h30	18	2,5	3,7	2,0	1,33
Capacité de la séquence kg de solution/m ²	185	146	290	17	18	6,6	10,2
Ratio débit final / initial %	19	27	14	19	6	7	8
Débit moyen kg/h/m ²	18	8,8	16,1	6,8	4,9	3,3	7,7
Fibrinogène antigénique g/L	2,7	3,1	3,0	3,4	3,4	3,2	3,2
Capacité de la séquence kg de fibrinogène / m ²	0,5	0,4	0,8	0,055	0,061	0,020	0,031

- [0162] Les nanofiltres asymétriques testés sur une solution de fibrinogène prépurifiée par chromatographie ayant une concentration d'au moins 2 g/L montrent des filtrabilités inférieures à 0.1 Kg de fibrinogène par m² tandis que le
- 5 procédé selon l'invention sur filtre symétrique permet d'atteindre une filtrabilité supérieure à 0,2 Kg de fibrinogène par m².

[0163] Exemple 6 : Evaluation de la réduction virale

[0164] I – Objectif :

Evaluer la réduction virale obtenue à l'aide du procédé selon l'invention.

10 **[0165] II – Préparation de la matière première :**

La composition comprenant du fibrinogène pré-purifié est obtenue selon la méthode décrite dans la demande EP1739093.

[0166] III – Préparation du tampon d'équilibrage du filtre :

Il s'agit du même tampon d'élution que celui utilisé pour la préparation de l'éluât de départ (Tp E DEAE Macroprep, ajusté à pH $7,5 \pm 0,1$ par acide citrique 1M).

[0167] IV – Séquence de filtration :

- 5 La composition de fibrinogène est préfiltrée à l'aide d'un filtre PES (Polyéther sulfone) modèle Minisart High flow de porosité $0,2 - 0,1 \mu\text{m}$ (100 nm).

La nanofiltration est réalisée sur le filtre Pegasus SV4 de Pall Life Sciences à une pression de $2,1 \pm 0,1$ bar.

- La charge virale est mesurée est produite à l'aide du produit PPV Ultrapure Gold
10 1% (v/v).

Un échantillon est prélevé dans la fraction nanofiltrée après la filtration de $79,2 \text{ L/m}^2$ de solution (volume chargé).

On observe un colmatage complet du filtre après filtration de $85,5 \text{ L}$ chargés par m^2 de membrane.

15 V – Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-après.

Ces résultats montrent que pour des capacités de fibrinogène de 250 g/m^2 de membrane la réduction virale mesurée est de $3,78 (\pm 0,56) \log_{10}$.

[0168] VI – Tableau récapitulatif des résultats

Volume chargé (L/m^2)	Charge fibrinogène cumulée (g/m^2)	Charge virale en entrée ($\log_{10}$ TCID ₅₀)	Charge virale en sortie ($\log_{10}$ TCID ₅₀)	Facteur de réduction virale ($\log_{10}$)
79,2	253	$8,11 \pm 0,17$	$4,33 \pm 0,22$	$3,78 \pm 0,56$

20

[0169] Exemple 7 : Evaluation de la capacité de filtration du fibrinogène sur filtre symétrique 20 nm en fonction de concentrations croissantes en arginine dans le tampon d'élution de l'étape de chromatographie**[0170] I – Objectifs**

- 25 Evaluer la capacité de filtration du fibrinogène avec des concentrations croissantes en arginine ajoutées dans le tampon d'élution de l'étape de chromatographie préalable à la séquence de filtration.

[0171] II – Paramètres opératoires

[0172] Les compositions de fibrinogène testées sont prépurifiées par chromatographie d'affinité selon la méthode décrite dans la demande EP1739093, en utilisant un tampon d'élution comprenant 50 mM de citrate de sodium et des

5 concentrations croissantes en arginine HCL (150mM, 200 mM, 400 mM)

[0173] Une séquence de filtration telle que décrite dans l'exemple 1 est ensuite réalisée sur l'éluat en vue d'étudier le profil de colmatage du fibrinogène sur le nanofiltre de porosité 20 nm.

[0174] III- Résultat :

10 **[0175]** Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après

<u>Tampon d'élution</u>	<u>Concentrations croissantes en arginine ajoutées au tampon d'élution</u>	<u>Capacité de nanofiltration (Kg/m²)</u>
Tampon pH 7.0 ± 0.2, Citrate de sodium 50 mM	Arginine HCL 150 mM	0.250 Kg/m ²
Tampon pH 7.0 ± 0.2, Citrate de sodium 50 mM	Arginine HCL 200 mM	>0.350 Kg/m ²
Tampon pH 7.0 ± 0.2, Citrate de sodium 50 mM	Arginine HCL 400 mM	> 0. 350 Kg/m ²

[0176] De façon inattendue, une composition éluee en chromatographie en tampon comprenant des concentrations croissantes en arginine, sans ajout supplémentaire d'arginine avant l'étape de nanofiltration, permet une

15 augmentation de la capacité de nanofiltration 20 nm du fibrinogène.

[0177] Ainsi et avantageusement, des concentrations croissantes d'arginine dans le tampon d'élution selon l'invention n'induisent pas de colmatage du filtre et permettent d'augmenter la capacité de nanofiltration du procédé, et ce, sans ajout d'arginine après l'étape de purification par chromatographie. .

Revendications

[Revendication 1] Procédé de filtration d'une composition de fibrinogène, comprenant les étapes suivantes:

- a) purification par chromatographie de la composition de fibrinogène à l'aide d'un
5 tampon d'élution comprenant de l'arginine ;
- b) optionnellement, au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène obtenue par élution de chromatographie à l'étape a), sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08 μm et 0,22 μm ,
- c) filtration de la composition de fibrinogène obtenue par élution de
10 chromatographie à l'étape a), ou optionnellement obtenue en b), sur filtre symétrique ayant une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, de préférence comprise entre 18 nm et 22 nm, et
- d) récupération de la solution résultante de fibrinogène,
ledit procédé de filtration étant réalisé sans ajout d'arginine après l'étape a), à une
15 capacité d'au moins 0,2 kg de fibrinogène/m² et ladite composition de fibrinogène n'étant pas préalablement congelée et/ou décongelée.

[Revendication 2] . Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend

- a) purification par chromatographie de la composition de fibrinogène à l'aide d'un
20 tampon d'élution comprenant de l'arginine ;
- b) au moins une étape de filtration de la composition de fibrinogène, sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08 μm et 0,22 μm , et récupération de la solution résultante de fibrinogène,
- b') filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b), sur filtre ayant des pores
25 de diamètre compris entre 15 nm et 50 nm,
- c) filtration de la solution de fibrinogène obtenue en b'), sur filtre symétrique ayant une taille de pores comprise entre 15 nm et 25 nm, et
- d) récupération de la solution résultante de fibrinogène.

[Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la composition de fibrinogène est obtenue à partir de fractions plasmatiques, de lait d'animal transgénique ou de surnageant de culture cellulaire.

- 5 **[Revendication 4]** Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la composition de fibrinogène présente une pureté supérieure ou égale à 70%.

[Revendication 5] Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la composition de fibrinogène est utilisée, de préférence sans dilution préalable, à une concentration d'au moins 1g/L.

- 10 **[Revendication 6]** Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'étape de purification par chromatographie est effectuée par chromatographie d'affinité, mixed-mode ou échangeuse d'ions.

[Revendication 7] Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de chromatographie est effectuée par chromatographie d'affinité.

- 15 **[Revendication 8]** Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la chromatographie d'affinité est une chromatographie d'affinité à ligands aptamères.

- [Revendication 9]** Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de purification par chromatographie est effectuée sur une matrice échangeuse d'ions à base de polymère naturel ou synthétique, résine ou gel, sur laquelle sont
20 greffés des groupements échangeurs d'anions de type base faible, de préférence le DEAE.

[Revendication 10] Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 200 mM.

- 25 **[Revendication 11]** Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 400 mM.

- [Revendication 12]** Procédé selon l'une des revendications caractérisé1 à 9 en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en
30 arginine d'au moins 600 mM.

[Revendication 13] Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine comprise entre 200 mM et 800 mM.

5 **[Revendication 14]** Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine comprise entre 200 mM et 600 mM.

[Revendication 15] Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine comprise entre 200 mM et 400 mM.

10 **[Revendication 16]** Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 200 mM et ledit procédé de filtration étant réalisé à une capacité d'au moins 0.25 kg/m².

15 **[Revendication 17]** Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 200 mM et ledit procédé de filtration étant réalisé à une capacité d'au moins 0.30 kg/m².

20 **[Revendication 18]** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 200 mM et ledit procédé de filtration étant réalisé à une capacité d'au moins 0.35 kg/m².

25 **[Revendication 19]** Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 400 mM et ledit procédé de filtration étant réalisé à une capacité d'au moins 0.25 kg/m².

[Revendication 20] Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 400 mM et ledit procédé de filtration étant réalisé à une capacité d'au moins 0.30 kg/m².

[Revendication 21] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé à l'étape a) comprend une concentration en arginine d'au moins 400 mM et ledit procédé de filtration étant réalisé à une capacité d'au moins 0.35 kg/m².

- 5 **[Revendication 22]** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape b) comprend deux étapes de filtration sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08µm et 0,22µm.

- [Revendication 23]** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la première filtration de l'étape b) est effectuée
10 sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,15µm et 0,22µm, de préférence d'environ 0,2 µm, et en ce que la seconde filtration est effectuée sur filtre ayant une taille de pores comprise entre 0,08µm et 0,15µm, de préférence d'environ 0,1 µm.

- [Revendication 24]** Procédé selon l'une quelconque des revendications
15 précédentes, caractérisé en ce que la solution obtenue en d) est concentrée par ultrafiltration .

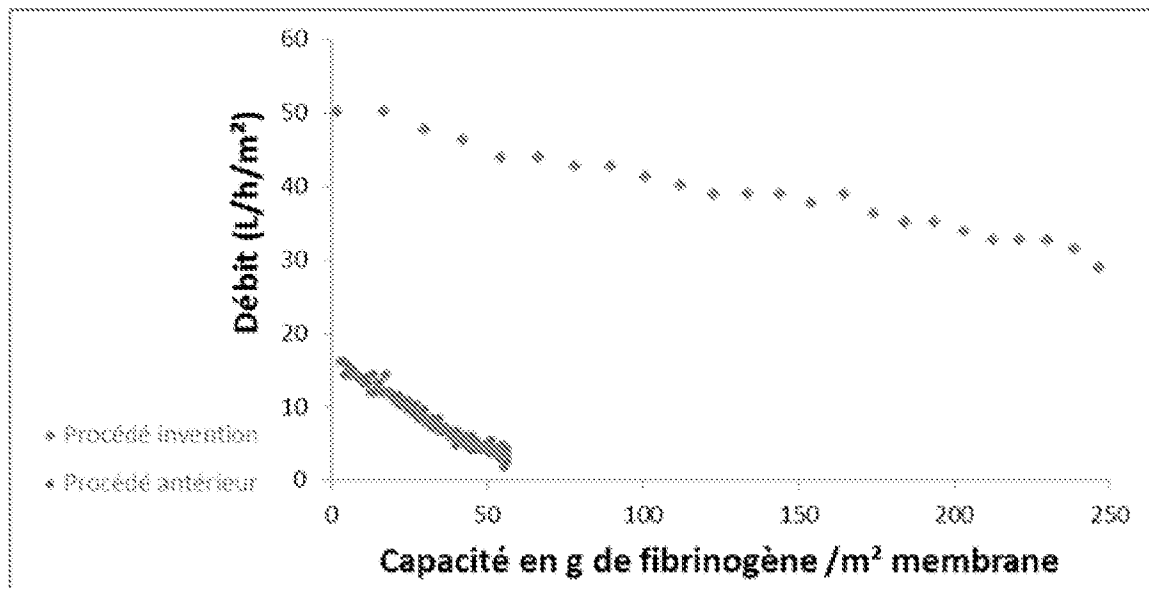
[Revendication 25] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution obtenue en d) est soumise à une étape de diafiltration.

- 20 **[Revendication 26]** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution obtenue en d), éventuellement diafiltrée, éventuellement concentrée, est lyophilisée.

[Revendication 27] Solution de fibrinogène susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

1/1

[Fig. 1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2019/053235**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 38/36**(2006.01)i; **A61L 2/00**(2006.01)i; **C07K 14/75**(2006.01)i; **C07K 1/34**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61L; C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014085861 A1 (CSL LTD [AU]) 12 June 2014 (2014-06-12)	27
Y	paragraph [0108] - paragraph [0114] claim 48; example 7	1-26
X	US 2003232969 A1 (LENGSFELD THOMAS [DE] ET AL) 18 December 2003 (2003-12-18)	27
Y	paragraph [0016] - paragraph [0020]	1-26
X	EP 1457497 A1 (PROBITAS PHARMA SA [ES]) 15 September 2004 (2004-09-15)	27
Y	cited in the application examples 3,5	1-26
X	US 2011114524 A1 (EIBL JOHANN [AT]) 19 May 2011 (2011-05-19)	27
Y	example 6	1-26



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 March 2020

Date of mailing of the international search report

17 March 2020

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Bladier, Cecile

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2019/053235

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CABALLERO SANTIAGO ET AL. "Robustness of nanofiltration for increasing the viral safety margin of biological products" <i>BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB</i> , Vol. 42, No. 2, 29 January 2014 (2014-01-29), pages 79-85 DOI: 10.1016/J.BIOLOGICALS.2013.10.003 ISSN: 1045-1056, XP028832457	27
Y	page 81; table 2	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2019/053235

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2014085861	A1	12 June 2014	AU	2013203357	A1	19 June 2014
				AU	2013354899	A1	16 July 2015
				BR	112015012854	A2	11 July 2017
				CA	2893373	A1	12 June 2014
				CN	104981476	A	14 October 2015
				CN	109125714	A	04 January 2019
				EP	2928905	A1	14 October 2015
				EP	3483173	A1	15 May 2019
				HK	1214833	A1	05 August 2016
				JP	6411360	B2	24 October 2018
				JP	2016501878	A	21 January 2016
				JP	2019011346	A	24 January 2019
				KR	20150090252	A	05 August 2015
				PL	2928905	T3	31 May 2019
				RU	2015126551	A	10 January 2017
				SG	10201704484Q	A	28 July 2017
				SG	11201504372U	A	30 July 2015
				US	2014154233	A1	05 June 2014
				US	2015158906	A1	11 June 2015
				US	2017143805	A1	25 May 2017
				US	2019209948	A1	11 July 2019
				WO	2014085861	A1	12 June 2014
US	2003232969	A1	18 December 2003	AU	2003200981	A1	02 October 2003
				CA	2421681	A1	15 September 2003
				DE	10211632	A1	09 October 2003
				DK	1348445	T3	01 July 2013
				EP	1348445	A1	01 October 2003
				ES	2410155	T3	01 July 2013
				JP	4495404	B2	07 July 2010
				JP	2003274941	A	30 September 2003
				KR	20030074461	A	19 September 2003
				NO	326670	B1	26 January 2009
				US	2003232969	A1	18 December 2003
EP	1457497	A1	15 September 2004	AR	043238	A1	20 July 2005
				AT	410438	T	15 October 2008
				AU	2004200745	A1	23 September 2004
				BR	PI0400375	A	04 January 2005
				CA	2459690	A1	06 September 2004
				CL	2004000261	A1	18 March 2005
				EP	1457497	A1	15 September 2004
				ES	2214967	A1	16 September 2004
				ES	2312944	T3	01 March 2009
				JP	4272562	B2	03 June 2009
				JP	2004269529	A	30 September 2004
				MX	PA04001829	A	08 September 2004
				NZ	531328	A	29 October 2004
				PL	1457497	T3	30 June 2009
				PT	1457497	E	10 December 2008
				US	2004173527	A1	09 September 2004
				US	2008274974	A1	06 November 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2019/053235

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2011114524	A1	19 May 2011	CA	2728358	A1	30 December 2009
				EP	2293776	A2	16 March 2011
				HU	E028626	T2	28 December 2016
				US	2011114524	A1	19 May 2011
				WO	2009155626	A2	30 December 2009

Demande internationale n°
PCT/FR2019/053235

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2019/053235

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CABALLERO SANTIAGO ET AL: "Robustness of nanofiltration for increasing the viral safety margin of biological products", BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB, vol. 42, no. 2, 29 janvier 2014 (2014-01-29), pages 79-85, XP028832457, ISSN: 1045-1056, DOI: 10.1016/J.BIOLOGICALS.2013.10.003	27
Y	page 81; tableau 2 -----	1-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2019/053235

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2014085861	A1	12-06-2014	AU 2013203357 A1	19-06-2014
			AU 2013354899 A1	16-07-2015
			BR 112015012854 A2	11-07-2017
			CA 2893373 A1	12-06-2014
			CN 104981476 A	14-10-2015
			CN 109125714 A	04-01-2019
			EP 2928905 A1	14-10-2015
			EP 3483173 A1	15-05-2019
			HK 1214833 A1	05-08-2016
			JP 6411360 B2	24-10-2018
			JP 2016501878 A	21-01-2016
			JP 2019011346 A	24-01-2019
			KR 20150090252 A	05-08-2015
			PL 2928905 T3	31-05-2019
			RU 2015126551 A	10-01-2017
			SG 10201704484Q A	28-07-2017
			SG 11201504372U A	30-07-2015
			US 2014154233 A1	05-06-2014
			US 2015158906 A1	11-06-2015
			US 2017143805 A1	25-05-2017
			US 2019209948 A1	11-07-2019
			WO 2014085861 A1	12-06-2014

US 2003232969	A1	18-12-2003	AU 2003200981 A1	02-10-2003
			CA 2421681 A1	15-09-2003
			DE 10211632 A1	09-10-2003
			DK 1348445 T3	01-07-2013
			EP 1348445 A1	01-10-2003
			ES 2410155 T3	01-07-2013
			JP 4495404 B2	07-07-2010
			JP 2003274941 A	30-09-2003
			KR 20030074461 A	19-09-2003
			NO 326670 B1	26-01-2009
			US 2003232969 A1	18-12-2003

EP 1457497	A1	15-09-2004	AR 043238 A1	20-07-2005
			AT 410438 T	15-10-2008
			AU 2004200745 A1	23-09-2004
			BR PI0400375 A	04-01-2005
			CA 2459690 A1	06-09-2004
			CL 2004000261 A1	18-03-2005
			EP 1457497 A1	15-09-2004
			ES 2214967 A1	16-09-2004
			ES 2312944 T3	01-03-2009
			JP 4272562 B2	03-06-2009
			JP 2004269529 A	30-09-2004
			MX PA04001829 A	08-09-2004
			NZ 531328 A	29-10-2004
			PL 1457497 T3	30-06-2009
			PT 1457497 E	10-12-2008
			US 2004173527 A1	09-09-2004
			US 2008274974 A1	06-11-2008

US 2011114524	A1	19-05-2011	CA 2728358 A1	30-12-2009
			EP 2293776 A2	16-03-2011
			HU E028626 T2	28-12-2016
			US 2011114524 A1	19-05-2011
			WO 2009155626 A2	30-12-2009