

⑭

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 18.05.90.

⑯ Priorité :

⑰ Date de la mise à disposition du public de la demande : 22.11.91 Bulletin 91/47.

⑱ Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑲ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑴ Demandeur(s) : *FONDATION NATIONALE DE TRANSFUSION SANGUINE — FR.*

⑵ Inventeur(s) : *Chtourou Abdessatar alias Sami.*

⑶ Titulaire(s) :

⑷ Mandataire : *Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf Warcoin Ahner.*

⑸ Procédé de préparation de facteur VIII de très haute pureté comprenant une étape rapide d'immunoabsorption.

⑹ L'invention concerne un procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe, contenant du Facteur VIII complexé au Facteur von Willebrand, procédé comprenant une étape d'immunoabsorption sur un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, caractérisé en ce que:

a) on ajoute audit mélange aqueux complexe des ions divalents en quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-Facteur von Willebrand;

b) on met en contact le mélange contenant le Facteur VIII avec un immunoabsorbant constitué d'un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII immobilisé par liaison covalente sur un support rigide, ledit anticorps monoclonal étant choisi tel qu'il soit dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et ait à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à lier le Facteur VIII par de fortes interactions hydrophobes;

c) on élue la solution de Facteur VIII de l'immunoabsorbant.

FR 2 662 166 - A1



L'invention a pour objet un procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe comprenant du Facteur VIII.

5 De nombreux procédés ont déjà été décrits, visant à préparer des formes purifiées de Facteur VIII humain, en raison de l'importance industrielle de ce facteur pour les hémophiles et surtout, de la nécessité de disposer de Facteur VIII dépourvu de contaminants.

10 Suivant les utilisations envisagées, une pureté plus ou moins grande est requise, soit que le Facteur VIII soit destiné à être utilisé tel quel dans une forme de pureté intermédiaire, soit qu'un état de pureté intermédiaire constitue justement un état transitoire avant la mise en oeuvre d'étapes ultérieures de purification plus poussée.

15 Pour préparer du Facteur VIII de très haute pureté, c'est-à-dire une pureté correspondant à une activité spécifique comprise entre environ 2000 et environ 6000 UI/mg de protéines, un certain nombre de procédés proposent de mettre en oeuvre, à partir de diverses sources de Facteur VIII, une étape d'immunoabsorption utilisant comme immunoabsorbant un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII.

20 Ainsi, la publication du brevet européen EP-A-0 286 323 décrit un procédé de purification de Facteur VIII à partir d'un mélange de polypeptides qui comprend une étape d'immunopurification puis d'élution de la solution purifiée de Facteur VIII, suivie d'une étape de chromatographie, l'étape d'immunopurification consistant à mettre en contact ledit mélange
25 avec un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, à laver le produit adsorbé pour éliminer le Facteur von Willebrand, puis à éluer la solution de Facteur VIII pour désorber le Facteur VIII de l'anticorps monoclonal anti-Facteur VIII.

30 En effet, dans tous les mélanges complexes contenant du Facteur VIII, tels que le plasma, le cryoprécipité remis en solution, les concentrés de pureté intermédiaire ou encore les surnageants de culture qui contiennent du vWF destiné à stabiliser le Facteur VIII, le Facteur VIII se

trouve complexé à son transporteur naturel qui est le facteur von Willebrand (vWF). Ce complexe de haut poids moléculaire (20.10^6 D) est stable et ne se dissocie qu'en présence d'ions divalents tels que le Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , à des concentrations généralement supérieures à 0,25 M. Le Facteur VIII est lui-même formé d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère associées par l'intermédiaire d'un ion calcium.

Dans les conditions indiquées dans le document cité ci-dessus, on a constaté que les temps nécessaires pour mettre en contact la totalité du mélange complexe à purifier avec l'immunoabsorbant sont relativement importants, de l'ordre de 15 à 30 heures. Ces durées sont probablement dues au fait que le Facteur VIII est mis en contact avec l'immunoabsorbant alors qu'il se trouve sous sa forme complexée au Facteur von Willebrand, ce qui tend à ralentir le processus. Ces conditions sont également souvent associées à un rendement assez faible, une partie non négligeable de Facteur VIII restant fixée sur l'immunoabsorbant ou même étant très rapidement déstabilisée avant même de pouvoir se fixer.

L'invention se propose de fournir des moyens pour obtenir plus rapidement et éventuellement avec un meilleur rendement que par les procédés connus, un Facteur VIII de très haute pureté, à partir de sources diverses de Facteur VIII.

L'invention se propose également de fournir un procédé de purification de Facteur VIII à partir d'un mélange aqueux complexe qui met en oeuvre une étape d'immunoabsorption, qui remédie aux inconvénients des procédés connus, et ce, quelle que soit la nature du mélange aqueux complexe de départ.

L'inventeur a maintenant découvert que, de façon surprenante, ce but est atteint lorsque, préalablement à l'étape d'immunoabsorption avec un immunoabsorbant contenant un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, le mélange aqueux complexe est mis en présence d'ions divalents en quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-vWF, l'anticorps monoclonal anti-Facteur VIII étant par ailleurs choisi tel qu'il est dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et a à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à lier le Facteur VIII par des fortes interactions hydrophobes.

C'est pourquoi l'invention a tout d'abord pour objet un procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe contenant du Facteur VIII complexé au Facteur von Willebrand, comprenant une étape d'immunoabsorption sur un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, caractérisé en ce que :

5 a) on ajoute audit mélange aqueux complexe des ions divalents en quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-Facteur von Willebrand ;

10 b) on met en contact le mélange obtenu en a) avec un immunoabsorbant constitué d'un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII immobilisé par liaison covalente sur un support rigide, ledit anticorps monoclonal étant dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et ayant à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à lier le Facteur VIII par des fortes interactions hydrophobes ;

15 c) on élue de l'immunoabsorbant la solution de Facteur VIII obtenue.

Ainsi, il est du mérite de l'inventeur d'avoir établi que en choisissant correctement l'anticorps monoclonal, il était possible de mettre en oeuvre l'étape d'immunoabsorption dans des conditions de dissociation du complexe Facteur VIII-vWF et, par là même, de diminuer de façon considérable le temps de contact entre le mélange complexe à purifier et l'immunoabsorbant.

25 Par temps de contact, on entend le temps nécessaire à la mise en oeuvre de l'étape b), jusqu'à fixation de la totalité du Facteur VIII présent dans le mélange complexe, déterminé pour une quantité de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal allant de 200 à 600 Ui.

30 En se fixant sur la chaîne légère du Facteur VIII, l'anticorps monoclonal inhibe l'activité coagulante par blocage du site d'activation par la thrombine. Ceci conduit à une stabilisation du Facteur VIII et peut dans certains cas contribuer à une amélioration du rendement de l'étape d'immunoabsorption.

En outre, dans les conditions indiquées, on constate que seul le Facteur VIII se fixe sur l'anticorps monoclonal.

On constate que selon l'invention, il est possible d'avoir des temps de contact inférieurs à 1 heure et 30 minutes, et même parfois inférieurs à 1 heure.

Avantageusement, le procédé selon l'invention s'applique à différents mélanges aqueux complexes, notamment : le plasma, le cryoprécipité remis en solution, un concentré de pureté intermédiaire, un concentré de haute pureté, un surnageant de culture contenant du Facteur VIII recombinant.

Les concentrations d'ions divalents nécessaires pour obtenir la dissociation du complexe FVIII-vWF dépendent à la fois de la nature des ions utilisés ainsi que de la source de Facteur VIII utilisée comme mélange complexe de départ. En pratique, une concentration allant de 0,1 à 0,6 M, de préférence de 0,2 à 0,4 M convient particulièrement bien.

Le concept à la base de l'invention repose sur la découverte qu'avec des anticorps monoclonaux anti-Facteur VIII présentant certaines caractéristiques précises, il est possible d'éviter les inconvénients habituellement liés à une concentration élevée d'ions divalents dans le mélange à purifier.

Ces inconvénients sont illustrés par la figure 1 qui montre en effet qu'en présence de sels dissociants tels que CaCl_2 , MgCl_2 , on obtient une quantité plus faible de Facteur VIII après une heure d'incubation, que lorsque le cryoprécipité est tel quel (exemple témoin).

Tous les ions divalents ayant un effet de force ionique peuvent être utilisés. De façon non limitative, on peut citer les ions Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} . Cependant, on utilisera de préférence les ions Ca^{++} , plus particulièrement sous la forme CaCl_2 ou gluconate de calcium ou sels apparentés.

En ce qui concerne le mélange aqueux de départ, il est préférable qu'il soit autant que possible débarrassé de ses contaminants éventuels avant l'étape d'immunoabsorption. C'est pourquoi, on procède avantageusement à une inactivation virale. Une telle opération peut par exemple être
5 réalisée selon le procédé décrit dans les brevets US 4 481 189 et US 4 540 573 qui utilisent un mélange solvant et détergent tel que le mélange Tween 80/TnBP (Tri-n-butyl phosphate).

La nature et les quantités de solvant et détergent à utiliser en pratique dépendent à la fois de la nature du mélange aqueux complexe et
10 de la nature des solvants et détergents.

D'une manière générale, il est avantageux de procéder à une inactivation virale de tous les produits qui interviennent dans la mise en oeuvre du procédé, c'est-à-dire notamment du support d'immobilisation des anticorps monoclonaux, comme des anticorps monoclonaux eux-mêmes.

15 Pour préparer l'immunoabsorbant utilisable selon l'invention, on prépare d'une part un support d'immobilisation des anticorps monoclonaux et d'autre part, les anticorps monoclonaux eux-mêmes.

Différents supports tels que les billes d'agarose, d'acrylamide, de silice, de polymères synthétiques ou encore à base de mélange de ces
20 substances peuvent être activés avec différents types de réactifs chimiques. On utilisera de préférence des gels de très forte porosité, notamment des gels d'acrylamide. On peut citer en particulier le gel formé d'un mélange de dextran et d'acrylamide Séphacryl S1000, commercialisé par la société Pharmacia, que l'on active avec de la benzoquinone selon une technique
25 classique décrite par Brandt et al, Bioch. Biophys. Acta, 1975, 386, 192-202.

En général, après élimination par différents lavages des groupements non réactifs, le gel activé est mis en contact avec la solution d'anticorps monoclonal. Afin de minimiser les fuites d'anticorps, il est préférable que le taux d'anticorps à immobiliser ne soit pas trop élevé.
30 C'est pourquoi, la concentration d'anticorps monoclonal est de préférence de 0,1 à 5 mg/ml de gel, plus préférentiellement encore de 0,3 à 1 mg/ml.

Ensuite, après une certaine durée de réaction de l'ordre de 24 heures, les protéines en excès sont éliminées par lavage. Les sites activés restants sont bloqués par addition de tampons, par exemple des tampons contenant de la glycine, de l'éthanolamine ou encore du Tris.

5 Pour préparer les anticorps monoclonaux (ACM), les cellules productrices de l'anticorps sont cultivées, soit in vivo chez des souris Balb/C, soit de préférence in vitro dans un cytotuteur dans un milieu approprié. Les ACM sont donc purifiés à partir soit de liquides d'ascites, soit de surnageants de culture. On utilisera de préférence des ACM tels que
10 décrits dans la publication de M. P. Croissant et al, Thrombosis and Haemostasis 56(3) 271-276, 1986, c'est-à-dire qui fixent 100 % de Facteur VIII en présence de CaCl_2 à une concentration de 0,25 M et plus particulièrement encore l'ACM désigné sous l'appellation 463A8 dans cette publication.

15 Enfin, selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, cette étape d'immunopurification est suivie d'une étape de chromatographie d'affinité, de préférence sur un échangeur d'ions anioniques. Cette étape de chromatographie vise à la fois à concentrer le Facteur VIII et à éliminer les anticorps monoclonaux d'origine murine qui auraient pu
20 contaminer le produit.

L'invention a plus particulièrement pour objet le procédé tel que décrit précédemment, dans lequel en tant que mélange complexe de départ, on utilise le plasma humain. Dans ces conditions, préalablement à l'étape b), on ajuste le pH aux environs de 6,5 à 6,8. Dans ce cas également, il sera
25 préférable, lorsqu'on effectue une inactivation virale, d'utiliser des quantités plus importantes du mélange d'inactivation virale approprié que celles utilisées pour les autres mélanges complexes.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront au cours de la description détaillée suivante de différents modes de
30 réalisation de l'invention.

Les figures 1 à 4 illustrent l'invention.

La figure 1 représente l'évolution de la quantité de Facteur VIII présent dans un cryoprécipité en fonction du temps d'incubation de ce cryoprécipité avec différents ions monovalents et divalents, le témoin étant le cryoprécipité.

La figure 2 représente l'évolution de la quantité de Facteur VIII non adsorbé sur une colonne d'immunoaffinité comprenant les ACM anti-Facteur VIII en fonction du temps de contact entre le Facteur VIII et l'ACM considéré, dans des conditions dissociantes et non dissociantes, le mélange complexe de départ étant un concentré de pureté intermédiaire inactivé viralement.

La figure 3 représente la même évolution que celle présentée à la figure 2, le mélange complexe de départ étant le plasma.

La figure 4 représente la même évolution que celle représentée à la figure 3, mais en comparant l'effet des ions divalents et monovalents, le mélange complexe de départ étant un concentré de pureté intermédiaire.

Comme indiqué ci-dessus, l'invention peut être mise en oeuvre à partir de diverses sources de Facteur VIII, qui peuvent être préparées de la façon suivante avant l'étape d'immunoabsorption.

a) plasma

Le plasma est décongelé rapidement. Après addition des ions divalents et éventuellement d'un mélange inactivation virale, il est mis en contact avec l'immunoabsorbant.

b) cryoprécipité

Pour préparer un cryoprécipité, on centrifuge du sang humain collecté en présence de citrate de sodium, afin d'éliminer la fraction cellulaire. Le plasma obtenu est congelé à -40°C dans des poches plastiques. On procède ensuite en trois étapes successives pour obtenir le cryoprécipité :

- Prédécongélation du plasma : il est réchauffé progressivement de manière à ce que sa température passe de -40°C à -11°C en 8 heures ;

- Décongélation du plasma : on élimine les poches plastiques puis on place le plasma congelé dans un broyeur pendant environ 2 minutes. On maintient la température de la suspension obtenue entre 0 et 0,5°C ;

5 - Séparation du cryoprécipité : on centrifuge la suspension à une température comprise entre 1 et 4°C.

Ensuite, il est généralement resuspendu dans un tampon tel que Tris-HCl 0,025 M pH 7. Après dissolution, 98 g (3% partie/volume) d'Al(OH)₃ sont ajoutés par kg de cryoprécipité de départ. Après 10 mn d'agitation, le mélange est centrifugé à 3000 g. Le surnageant est éventuellement inactivé viralemment puis les ions dissociants sont ajoutés et la solution est mise en contact avec l'immunoabsorbant.

c) Facteur VIII de pureté intermédiaire

Le cryoprécipité est remis en suspension dans un tampon puis les protéines contaminantes sont éliminées et le Facteur VIII peut être récupéré sous forme d'une solution concentrée ayant une activité spécifique aux environs de 1 Ui/mg. L'inactivation virale et la dissociation du Facteur VIII peuvent être réalisées comme pour la préparation du cryoprécipité.

Pour l'ensemble des exemples de réalisation qui vont suivre, la préparation de l'immunoabsorbant se fait dans les conditions indiquées ci-après :

Obtention des anticorps monoclonaux

1° - Immunisation

Une souris Balb/c est immunisée de la façon suivante, avec un Facteur VIII purifié de la façon décrite dans la publication M.P. Croissant et al, déjà citée.

Semaines 1 et 4 : Injection sous cutanée de 150 µl d'Al(OH)₃ contenant 50 UI de Facteur VIII ;

Semaine 8 : Injection par voie intraveineuse de 50 UI de Facteur VIII. 3 jours après la dernière injection, l'animal est sacrifié pour le prélèvement de la rate.

2° - Fusion et production d'hybridomes murins

Les splénocytes murins sont fusionnés avec des cellules myélomateuses NS1 dans un rapport 10:1.

Les cellules sont par la suite sélectionnées sur un milieu HAT puis testées quant à leur aptitude à sécréter des anticorps répondant à ces
5 deux critères :

- Aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C
et - Aptitude à lier le Facteur VIII par de fortes interactions hydrophobes.

Les cellules répondants à ces critères ont été clonées par dilution
10 limite.

582 hybrides ont été ainsi testées. 20 % des surnageants cellulaires contiennent des anticorps anti-Facteur von Willebrand et 2,5 % des anticorps anti-Facteur VIII:C. Parmi les lignées stables après clonage, et sécrétant un anticorps anti-Facteur VIII:C la lignée CAG-1 463A8 a été
15 sélectionné (M.P. Croissant et al, déjà citée).

3° - Préparation des anticorps monoclonaux

Les cellules productrices sont cultivées in vivo dans un cytoculteur dans un milieu approprié.

Le protocole de purification suivant peut être appliqué.

20 1. Séparation des cellules et débris cellulaires par une filtration tangentielle sur 0,45 puis 0,22 μ ;

2. Concentration 10 fois du surnageant de culture par ultrafiltration.

25 3. Chromatographie sur protéine A Sépharose FF commercialisée par la société Pharmacia.

4. Ajustement du pH et de la résistivité de l'éluat de la protéine A Sépharose.

5. Chromatographie d'échange d'ions anioniques par exemple sur Q Sépharose FF.

30 6. Dialyse et ultrafiltration pour ajuster le taux d'anticorps à la concentration voulue.

7. Inactivation virale de la solution d'anticorps par pasteurisation.

8. Congélation à -80°C jusqu'à libération du lot après contrôle.

5 Immobilisation de l'anticorps monoclonal

Après lavage avec des tampons de pH extrême (pH 4 et pH 9) et des agents chaotropes, c'est-à-dire des agents susceptibles de casser les interactions hydrophobes, afin d'éliminer les molécules fixées de façon aspécifique, le gel d'immunoaffinité est stocké à 4°C en présence d'agents empêchant la croissance des microorganismes.

De préférence, avant son utilisation, le gel est mis à incuber pendant 24 heures en présence d'un mélange d'inactivation virale tel que cité précédemment.

15 Tampons utilisés dans les exemples :

Immunoaffinité :

- tampon d'équilibrage (tampon A) :

Imidazole-HCl 20 mM, pH 6,8 ; NaCl 150 mM,

- tampon d'élution (tampon B) :

20 Imidazole 10 mM pH 7, NaCl 0,075 M, éthylène glycol 50 %, Tween 80 1 %. L'ajout d'un détergent dans le tampon d'élution est particulièrement avantageux et il permet d'améliorer encore le rendement de l'étape.

25 Chromatographie par échange d'ions

- tampon d'équilibrage (tampon C) :

Tris-HCl 20mM, pH7, NaCl 0,27 M,

- tampon d'élution (tampon D),

glycine 0,1 M, lysine 0,03 M, NaCl 0,05 M, CaCl_2 , 0,3 M, pH7

30 - tampon de dialyse (tampon E) :

glycine 0,1M, lysine 0,03 M, NaCl 0,2M, CaCl_2 1mM, pH7.

Exemple de mise en oeuvre du procédé à partir d'un concentré de pureté intermédiaire

4 kg de cryoprécipité, obtenus à partir de 524 l de plasma ont été remis en solution dans un tampon Tris 20 mM pH 7. Le pH de la solution est ensuite ajusté à pH 7,1 et les principaux contaminants protéiques tels que fibronectine, fibrinogène, IgG sont éliminés en deux temps : une première précipitation à l'héparine obtenue par ajout de 24 unités d'héparine par ml de solution à 20°C, et le précipité formé est éliminé par centrifugation ; ensuite, on ajoute 22 g de gel d'hydroxyde d'aluminium par litre de solution, puis on abaisse le pH à 6,00. Le précipité formé est éliminé par centrifugation.

On ajoute du CaCl_2 jusqu'à atteindre une concentration finale de 0.25M puis on ajoute un mélange d'inactivation virale à une concentration de 1% de Tween 80 et 0,3 % de TnBP, puis on incube pendant 6 heures à 24°C.

La solution est alors prête pour l'étape d'immunoabsorption.

L'immunoabsorption est ensuite réalisée de la façon suivante :

Pour préparer la colonne, on la remplit avec 1,2 l du gel d'immunoaffinité (le Séphacryl S1000 activé à la benzoquinone) où se trouve fixé l'anticorps monoclonal 463A8 à une concentration de 0,5 mg/ml de gel en présence du mélange d'inactivation virale déjà décrit. La colonne est conservée ainsi 24 heures à 20°C, puis transférée dans une zone hors virus (ZHV) où le gel est équilibré par 10 volumes colonne de tampon A. 23,5 l de la solution de Facteur VIII prépurifiée, obtenue précédemment sont injectés dans la colonne à un débit de 16 volumes colonne/heure.

Les protéines non retenues sont éliminées par lavage de l'immunoabsorbant avec 10 volumes colonne de tampon d'équilibrage A avec un débit de 16 volumes colonne/heure.

Le Facteur VIII est élué avec 6,5 volume colonne d'un tampon B avec un débit de 8 volumes colonne/heure.

L'étape d'immunopurification est suivie d'une étape de chromatographie d'échange d'ions, selon laquelle 900 ml de Q Sépharose FF (gel commercialisé par Pharmacia) sont placés dans une colonne en présence d'éthanol à 20 % puis lavés successivement avec 2 l NaOH 0,5 N, 5 l d'eau distillée, 3 l NaCl 2M, 5 l d'eau distillée, puis enfin, équilibrés avec 7 l du tampon C. L'éluat récupéré de la colonne d'immunoaffinité est alors injecté à un débit de 12 l/h. A la fin de l'injection, le gel est lavé avec 9 l de tampon d'équilibrage A. Le Facteur VIII est élué avec 3 l de tampon d'élution D à un débit de 6 l/h. Ensuite, pour préparer du Facteur VIII prêt à la commercialisation, on dialyse la solution de Facteur VIII obtenu après addition d'albumine contre 6 volumes d'un tampon E à un débit de 15 l/h. La solution est ensuite filtrée stérilement, répartie en dose unitaire puis lyophilisée.

Le temps nécessaire pour charger la solution de Facteur VIII (324.5 UI de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal) dans la colonne d'immunoaffinité est de 1 h 20 mn, le lavage dure 45 mn et l'élution dure 58 mn.

Le tableau suivant représente les différentes caractéristiques du procédé selon l'invention. Les résultats comportent à la fois le rendement de chaque étape du procédé et le rendement global du procédé.

ETAPE	FVIII:Unités totales (U/ml)	Rendement étape (%)	Rendement procédé (%)	Activité spécifique
Plasma humain	524 600*	100	---	0,016
Cryoprécipité	244 000	46,5	100	0,4
Concentré de pureté intermédiaire	194 700	79,8	79,8	1
(inactivé viralement par un mélange solvant/détergent)				
Immunopurification	169 500	87	69,5	---
Echange d'ions	152 500	89,9	62,5	2400
Dialyse	144 800	94,9	59,3	9,6

* Plasma estimé arbitrairement à 1 U/ml non dosé.

Un exemple comparatif a été réalisé dans les conditions indiquées dans le document EP-A-0 286 323, c'est-à-dire que l'immunopurification ne comporte pas l'étape a) mais comporte après l'étape b) une étape supplémentaire pour éliminer le Facteur von Willebrand. Dans ces conditions, le temps nécessaire pour charger la solution de Facteur VIII dans la colonne est de 27 heures, le lavage comportant la nécessité d'éliminer le Facteur von Willebrand dure 10 heures et l'élution dure 3 h 20 minutes. Le gain de temps obtenu selon l'invention est donc significatif.

Cet exemple est par ailleurs illustré par la figure 2 qui montre bien qu'après 50 mn de contact selon l'invention, 10 % environ de Facteur VIII seulement n'est pas adsorbé, alors que ce pourcentage s'élève à près de 65 % lorsque le Facteur VIII n'a pas été préalablement dissocié.

La figure 4 illustre par ailleurs l'intérêt de l'utilisation d'ions divalents plutôt que d'autres ions, en particulier des ions monovalents tels que NaCl. En effet, même si, d'après la figure 1, NaCl a tendance à déstabiliser moins rapidement le Facteur VIII que CaCl₂, le Facteur VIII est adsorbé beaucoup plus rapidement lorsqu'il a été dissocié avec des ions divalents.

Exemple de purification du Facteur VIII à partir du plasma

a) Exemple comparatif, dans des conditions non dissociantes.

1000 ml de plasma inactivé viralement (Tween 80 2%, TnBP 0,6 %) pH 6,8 sont mis à incuber avec 10 ml de gel d'immunoaffinité pendant 16 heures, soit 200 UI de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal, l'ACM anti-Facteur VIII étant l'ACM463A8, à une concentration de 0,5 mg/ml de gel. Cette durée est celle nécessaire pour l'adsorption de 100 % de Facteur VIII présent dans le milieu à + 4°C. Le gel est ensuite transféré en colonne, lavé avec un tampon imidazole 20 mM, pH 7, NaCl 0,15 M, jusqu'à élimination des protéines contaminantes (suivie par densitométrie jusqu'à annulation de la densité optique à 280 nm).

Ensuite, le gel est lavé avec un tampon imidazole 20 mM, pH 6,8, CaCl₂ 0,25 M, pour éluer le vWF. Le Facteur VIII est élué ultérieurement avec un tampon imidazole 10 mM pH7 NaCl 0,075 M éthylène glycol 50 % Tween 80 1 %. Le rendement en Facteur VIII est de 24 %.

5

b) Selon l'invention

A 1000 ml de plasma, on ajoute CaCl₂ à une concentration finale de 0,113 M, on inactive viralemement le plasma avec un mélange de 2 % de Tween 80 et de 0,6 % de TnBP, et on ajuste le pH à 6,8.

10

On effectue l'immunoabsorption en colonne avec un débit de 120 ml/cm²/h, dans une colonne de 5 cm de diamètre, ce qui correspond à un débit volumique de 2,4 l/heure et à un temps de charge de 25 mn pour 1 l de plasma. Le rendement en Facteur VIII est de 61 %.

15

Le même essai répété 10 fois donne à chaque fois des rendements à peu près constants, aussi bien pour l'exemple comparatif que pour l'exemple conforme à l'invention (respectivement 24,3 ± 2,3 % et 61,1 ± 6,3 %).

20

La figure 3 illustre bien cet aspect de l'invention appliqué au plasma. Après 25 mn pratiquement tout le Facteur VIII est adsorbé selon l'invention, tandis que près de 70 % ne l'est pas selon l'exemple comparatif.

25

30

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe, contenant du Facteur VIII complexé au Facteur von Willebrand, procédé comprenant une étape d'immuno-adsorption sur un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, caractérisé en ce que :

5 a) on ajoute audit mélange aqueux complexe des ions divalents en quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-Facteur von Willebrand ;

10 b) on met en contact le mélange obtenu en a) avec un immunoadsorbant constitué d'un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII immobilisé par liaison covalente sur un support rigide, ledit anticorps monoclonal étant dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et ayant à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à
15 lier le Facteur VIII par de fortes interactions hydrophobes ;

c) on élue la solution de Facteur VIII de l'immunoadsorbant ;

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape b) est poursuivie jusqu'à adsorption de la totalité du Facteur VIII présent dans le mélange complexe.

20 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que, pour 200 à 600 UI de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal, le temps de contact est inférieure à 1 heure 30 minutes, de préférence inférieur à 1 heure.

25 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit mélange est choisi parmi le plasma, le cryoprécipité remis en solution, un concentré de pureté intermédiaire, un concentré de haute pureté, un surnageant de culture contenant du Facteur VIII recombinant.

30 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les ions divalents sont ajoutés à des concentrations allant de 0,1 à 0,6 M, de préférence de 0,2 à 0,4 M.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les ions divalents ajoutés à l'étape a) sont choisis parmi Mg^{++} , Mn^{++} , Ba^{++} , Ca^{++} .

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les ions divalents sont les ions Ca^{++} .

8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit mélange est inactivé viralement.

5 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit support et/ou ledit anticorps monoclonal sont inactivés viralement.

10 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le support de l'étape b) comprend un gel de très forte porosité.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gel d'acrylamide.

15 12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration d'anticorps monoclonal est de 0,1 à 5 mg/ml, de préférence de 0,3 à 1 mg/ml.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le mélange complexe est le plasma humain et préalablement à l'étape b), on ajuste le pH aux environs de 6,5 à 6,8.

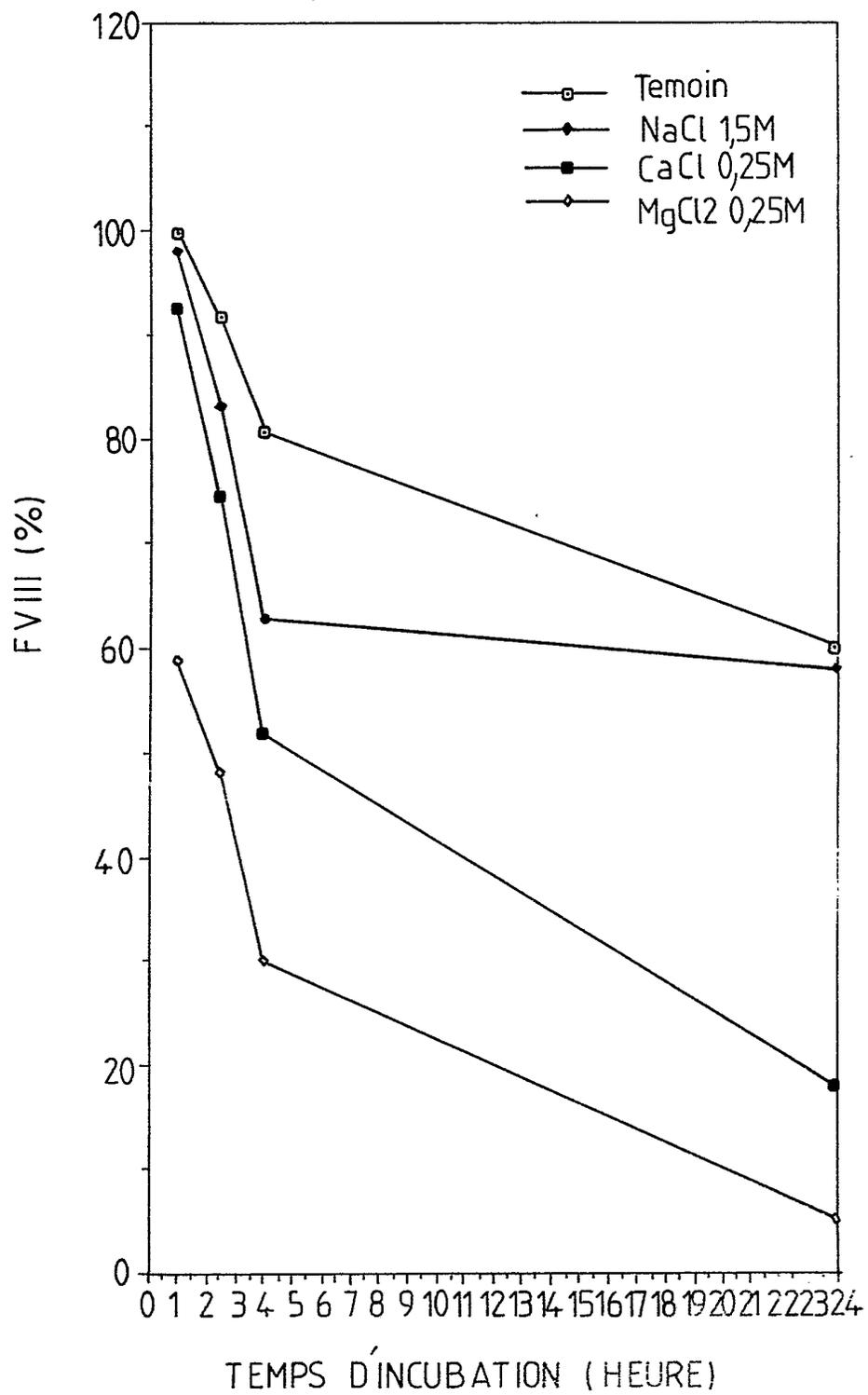
20 14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que en tant qu'anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, on utilise un anticorps monoclonal qui fixe 100 % de Facteur VIII, en présence de CaCl_2 à une concentration de 0,25 M.

25 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que à l'étape c) on utilise un tampon d'élution qui comprend un détergent.

16. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend une étape d) selon laquelle on chromatographie par échange d'ions la solution de Facteur VIII éluee à l'étape c).

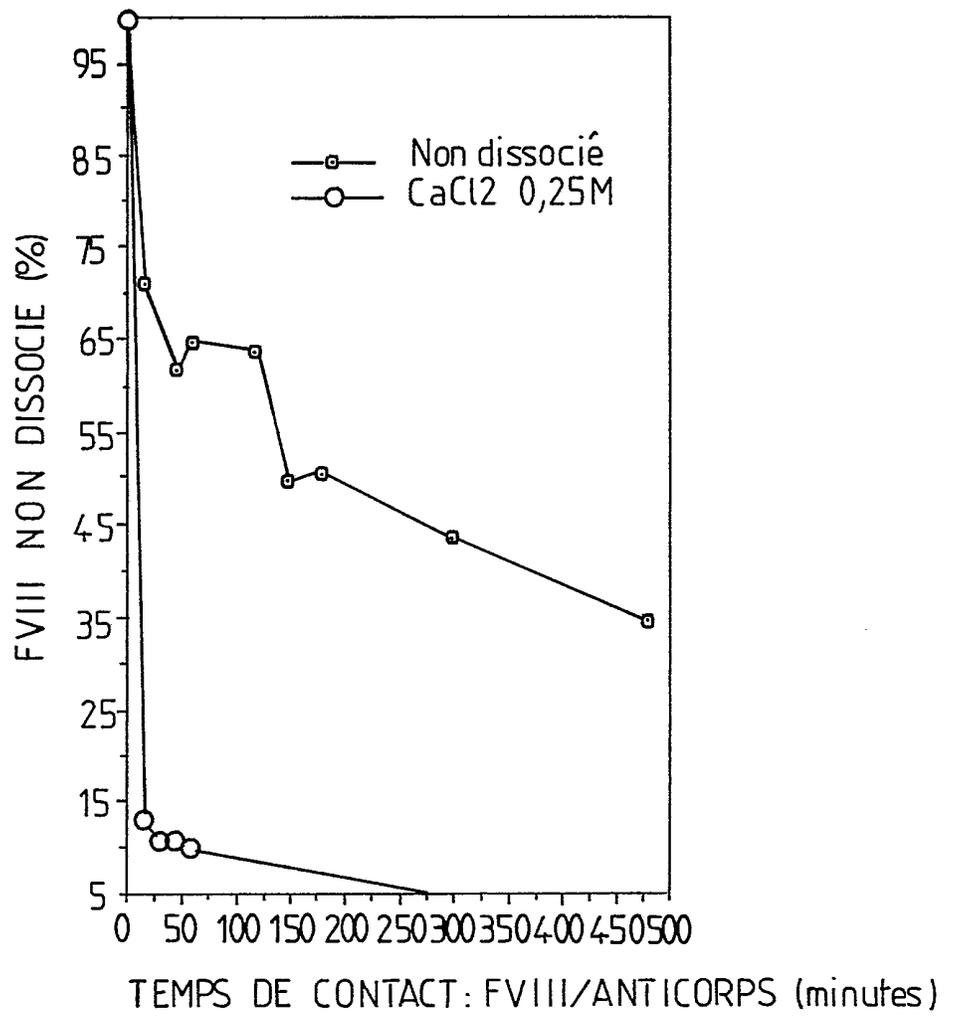
1/4

FIG.1



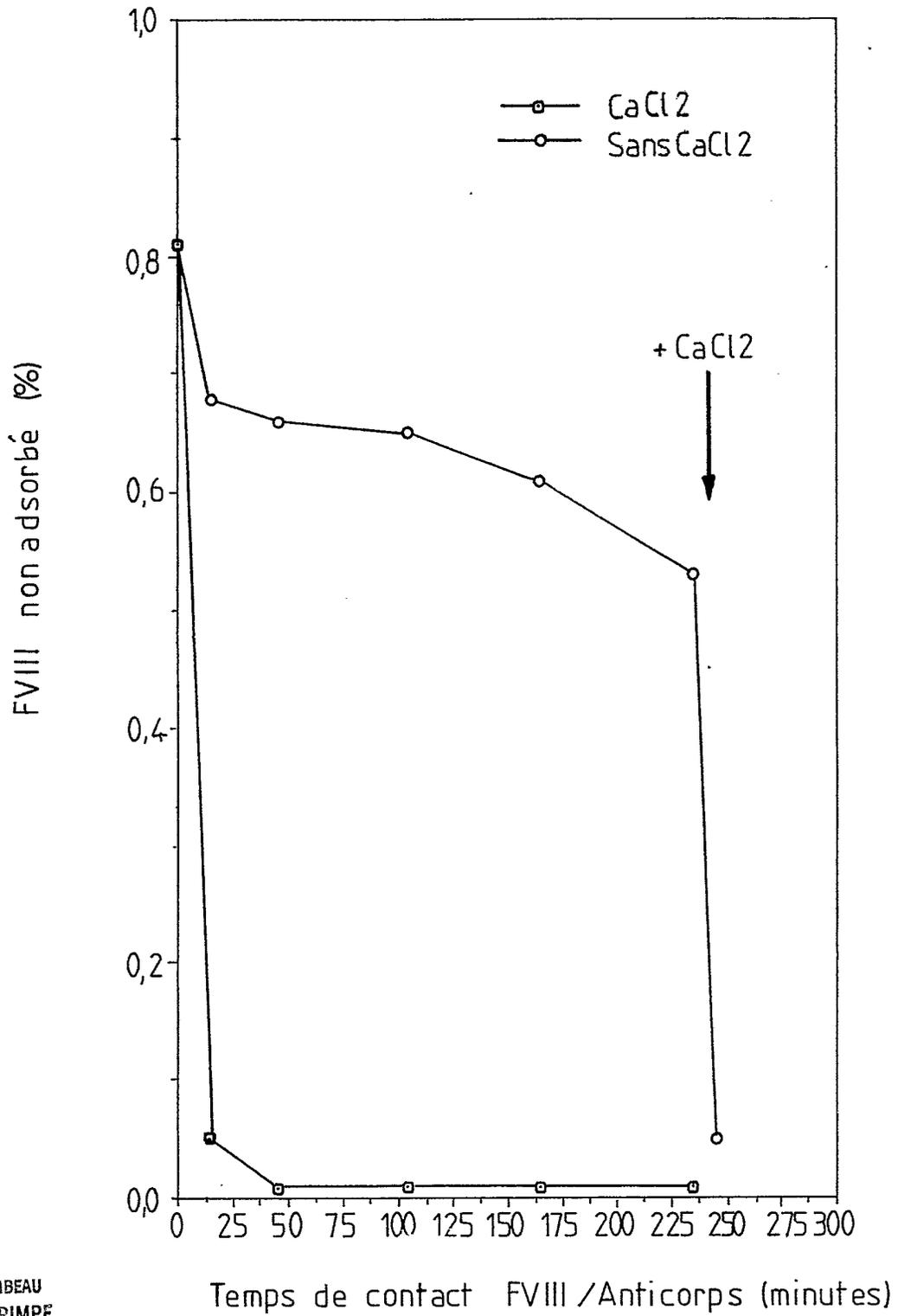
2/4

FIG:2



3/4

FIG. 3



CABINET REGIMBEAU
MARTIN, SCHRIMPF
WARCOIN, AHNER
ORIGINAL

4/4

IMMUNOAFFINITE
CINETIQUE DE FIXATION DU FVIII EN
CONDITION DISSOCIANTE ET NON DISSOCIANTE

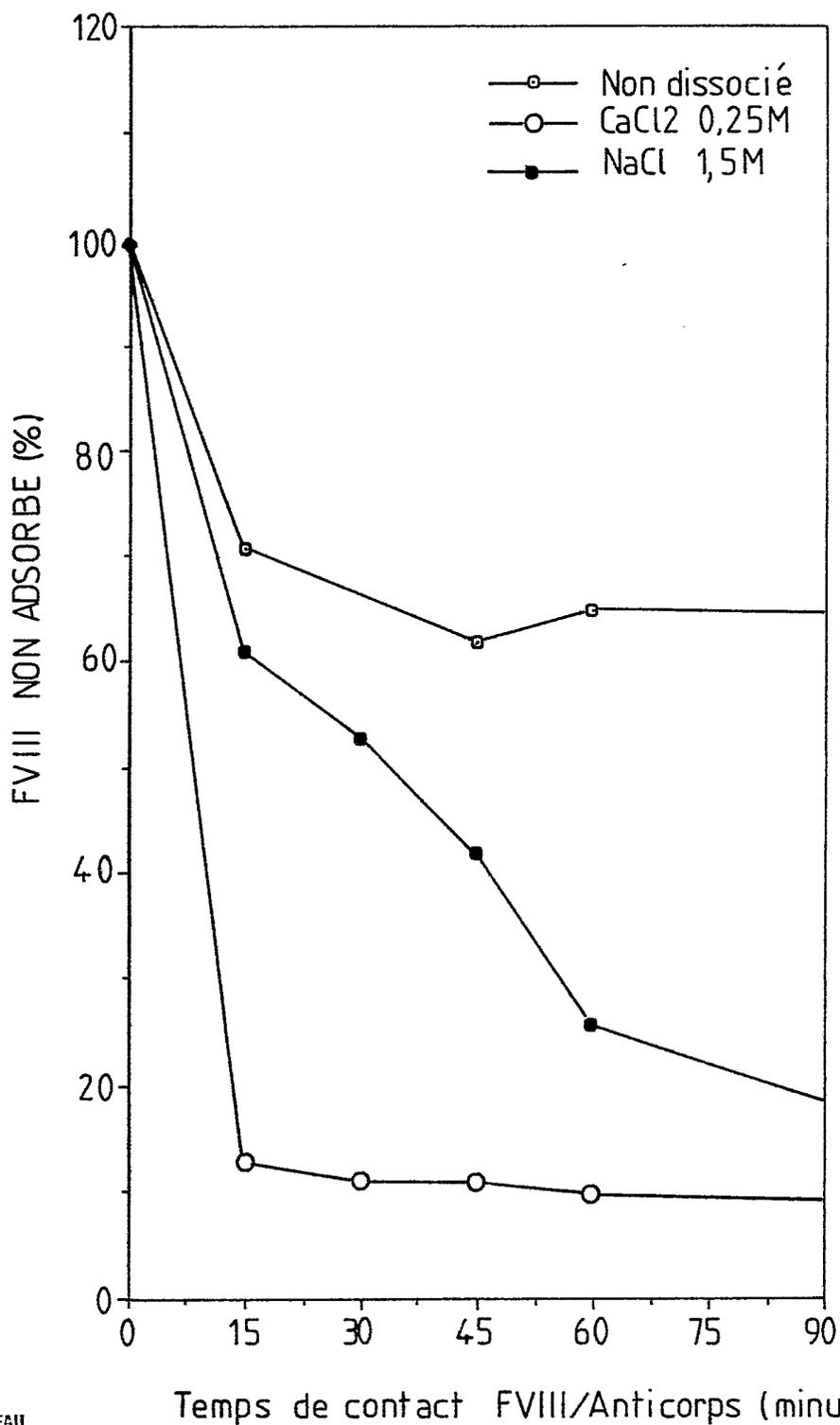


FIG.4

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9006252
FA 442179

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,Y	EP-A-0 286 323 (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES INC.) * En entier * ---	1-16
Y	EP-A-0 123 945 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) * Page 11 * ---	1-16
Y	EP-A-0 152 746 (CHIRON CORP.) * En entier * -----	1-16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C 07 K A 61 K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
15-01-1991		NOVOA Y SANJURJO M.A.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)